2008.03.15

UPLC/MS/MS システム取扱説明書
分析操作手順
（定量 編）

目次（定量編）

Ⅰ はじめに 1
Ⅱ MRM モードによる定量分析の流れ 2
Ⅲ MRM モードによる定量分析の実際 3
1 標準物質の準備 3
2 QuanOptimize 法による MS 分析メソッド（MS file）の作成 3
①LC と MS の準備 3
②QuanOptimize メソッドファイルの作成 5
③Compound Sample List ファイルの作成 8
④QuanOptimize の実行 10
⑤処理中のクロマトグラムの表示 12
⑥MS 分析メソッド(MS file)の確認と作成 15
⑦MS 分析メソッド(MS file)の新規作成と編集 16
3 LC メッソッド(Inlet file）の作成 18
①ポンプのグラジェント設定 18
②オートサンプラーの設定 19
③PDA の設定 19
4 サンプルリストの作成 20
5 分析の実行 24
6 定量メソッドの作成 26
①Compound property の設定 27
②検量線関連パラメーターの編集 28
③波形解析パラメーターの編集 29
7 定量メッソッドの実行と結果の表示 30

Ⅰ はじめに

「定量」編では「起動と終了」編にしたがって，UPLC/MS/MS システムが正常に起動されていることが前提です。起動操作を行っていない場合は，まず「起動と終了」編にしたがってシステムを立ち上げてください。

起動完了時のシステムの状態は次のようになっています。

- MS 本体の状態：VACCUM ランプ点灯，Operate ランプ点灯，LOAD ランプ点灯。
- MassLynx（ソフトウェア）の状態：自分専用のプロジェクトが開かれていること。
- UPLC の状態：インジェクター，バイナリーポンプ，PDA 検出器の電源が投入されており，すべてのインジケータが緑色に点灯していること。

※UPLC/MS/MS では利用できる溶媒が限られています（定性編 49ｐ参照)。あらかじめ，お持ちの HPLC とカラムを使用して，目的物質がこれらの溶媒で分離可能かどうか確かめておいてください。

既知物質の定量を行うには，MRM(Multiple Reaction Monitoring)と SIR(Selected Ion Recording)の２つのモードがあります。

① MRM モードは，MS1 で目的物質のイオン種（プリカーサイオン）を特定し，このプリカーサイオンをコリジョンセル内で Ar ガスと衝突させてイオンを活性化し，強制的にエネルギーを付与して分解されたイオン（プロダクトイオン）を MS2 に導入して複数または一つのプロダクトイオンの強度を測定することにより，同定と定量を行います。

② SIR モードは，MS1 のみでプリカーサイオンの強度を測定し，それによって同定と定量を行います。MRM は SIR に比べて，選択性と感度が高い方法です。ここでは MRM モードを利用して，外部標準法において定量を行う方法について説明します。

Ⅱ MRM モードによる定量分析の流れ

1 標準物質の準備

分析対象となる標準物質を準備します。

2 MS 分析メソッド（MS file）の作成

本機に装備されている QuanOptimize 法により, MS1 で得られるプリカーサイオンと MS2 で得られるプロダクトイオンの最適な生成条件を自動的に決定し，これらの条件を記述した MS 分析メソッド（MS file）を作成します。これを行うには，分析対象となる標準物質の名前，化学式または質量数を記述した Compound Sample List ファイルを準備する必要があります。

3 LC メソッド(Inlet file)の作成

LC の作動条件を記述した LC メソッド(Inlet file)を作成します。

4 サンプルリストの作成

検量線に使用する標準物質と測定対象となるサンプルのファイル名と試料の名称，利用する MS file と Inlet file，Injection volume などのパラメーターを指定します。

5 分析の実行

サンプルリストにしたがって分析を実行します。

6 定量メソッドファイルの作成

定量方法のパラメーターを指定した定量メソッドファイルを作成します。

7 定量メソッドの実行と結果の表示

分析したデータを定量メソッドファイルにしたがって自動的に解析し，目的物質の定量を行います。

MS file，Inlet file，定量メッソッドファイルは一度作成すれば測定条件を変更しない限り，再利用できます。

・ルーチンで分析を行う場合は，上記のうち

4.サンプルリストの作成

5.分析の実行

7.定量メソッドの実行と結果の表示

の３項目を行うだけです.

Ⅲ MRM モードによる定量分析の実際

1 標準物質の準備

分析対象の標準物質を LC の移動相と同じ組成の溶媒に溶解し，0.2μm のフィルターにろ過してください。LC は A/B＝50/50 のアイソクラティックモードで動作させますので，標準物質を溶解する溶媒も A/B＝50/50 のものを使用してください。標準物質の濃度は 0.1mmol／L 以下としてください。これを指定のバイアルに分注し，サンプルトレーにセットします。

2 QuanOptimize 法による MS 分析メソッド（MS file）の作成

プリカーサイオンがポジティブイオンかネガティブイオンで観測されるのか，それらの最適なイオン化電圧（コーン電圧）がどのくらいか，また得られたプリカーサイオンからプロダクトイオンを生成するのに最適なコリジョンエナジーはどのくらいかを自動的に決定します。

①LC と MS の準備

カラムを使用せずに内径 0.2mm のパイプを用い，サンプルを拡散させてブロードなピークを作り，その間にイオンの測定を行います。これをフローインジェクション法と呼びます。

カラムオーブンからカラムを取り外し，図 1 のようにパイプを接続してください。

図 1　フローインジェクション用パイプの接続

Inlet method の ACQUITY Additional Status タブをクリックし，使用する移動相を A/B＝50/50 のアイソクラティックとし，流速は 0.2mL/min とする（図 2）。

①Pump on/off ボタンをクリックし，ポンプを作動させる。

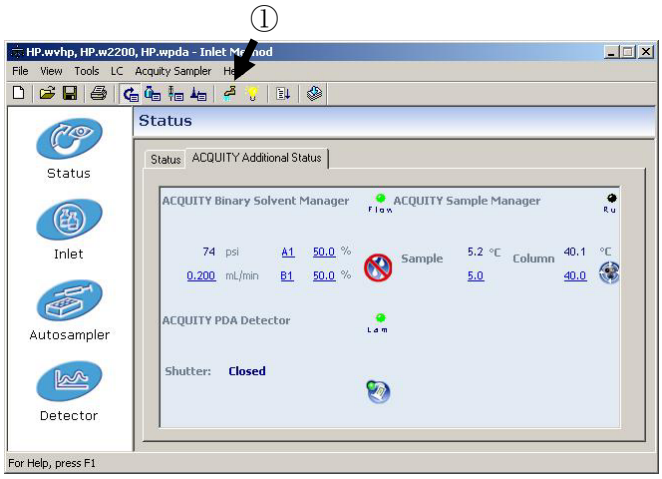


図 2　フローインジェクション法による Inlet method の指定

MS 本体の Inject ボタンを押し，LC から MS に溶媒が供給されるようにします。
MS tune 画面で，MS tune ファイル：MSMS.ipr を読み込みます。

②QuanOptimize メソッドファイルの作成

QuanOptimize をどのように実行するかの条件設定を行います。MassLynx メイン画面の①Shortcut, ②QuanOptimize, ③Edit Method をクリックし, QuanOptimize Method Editor を起動します（図 3)。

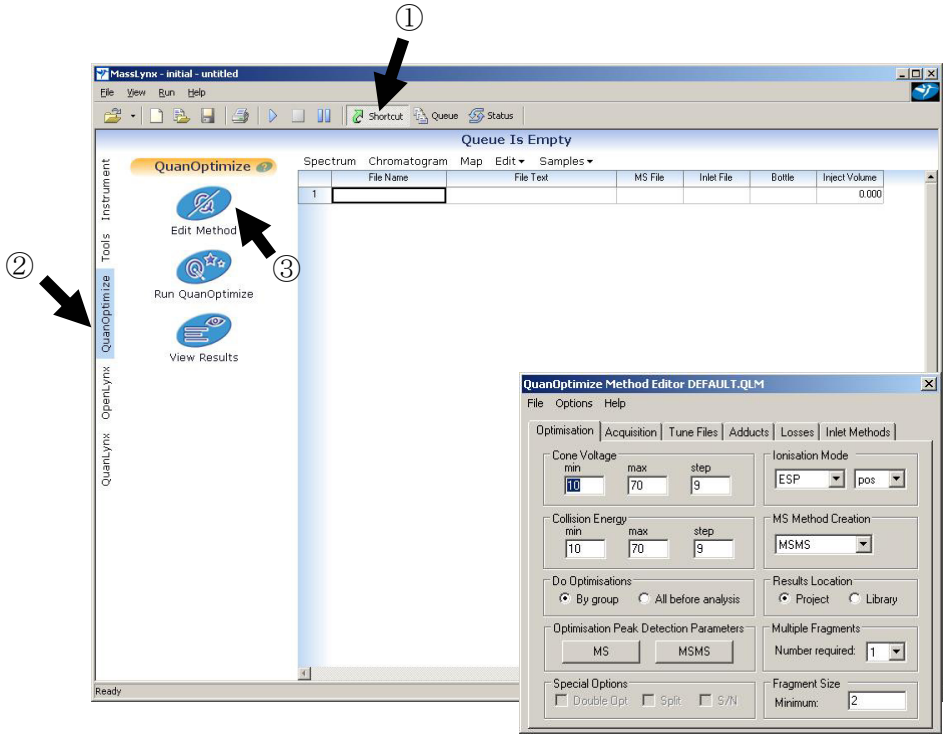


図 3 QuanOptimize Method Editor の起動

[File]-[Open]で QuanOptimize を選択し，読み込む（図 4)。

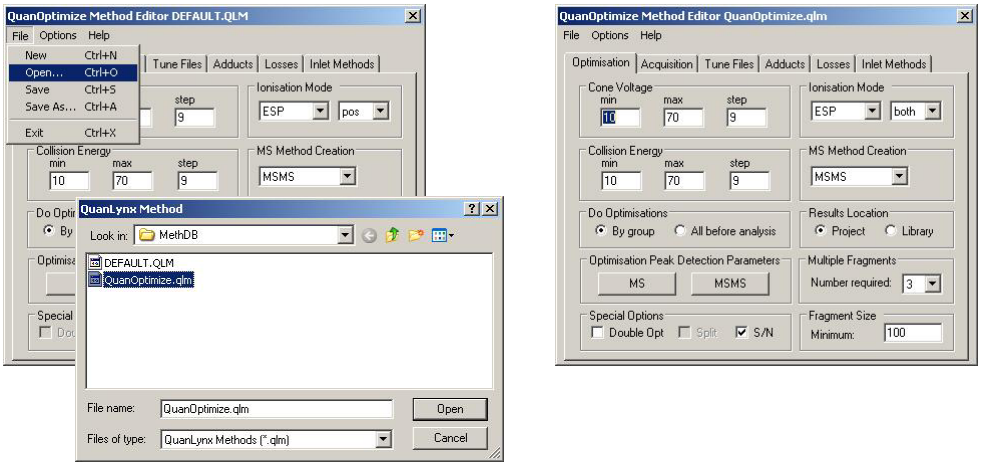


図 4　QuanOptimize の設定

画面に表示されているすべての項目を表 1 にしたがって設定する。

表 1　QuanOptimize Method Editor の設定項目

Optimisation タブ	Cone Voltage	min から max を 10 から 70 の範囲で指定する。Step は min から max に変化させる電圧の幅。最大 8 ポイントしかきりかえできません。	
	Collison Energy	同上	
	Do optimization	By group	on
		All before analysis	off
	Optimisation peak Detection parameters	MS ボタンをクリック	Enable smoothing と Apex Track Peak Integration にチェックを入れる Smooth ボタンを押す Window size :2 Number of smooths:2 Smoothing method:Mean
		MSMS ボタンをクリック	同上
	Special options	Double Opt	off
		S/N	on
	Ionisation mode	任意のイオン化法（ESP 推奨）を選択し，both とする。	
	MS Method Creation		MSMS
	Results locaton	Project	on
		Library	off
	Multiple Fragments	Number required	3（必ず 1 以上設定する）
	Fragment Size	Minimum	50（最小フラグメントイオンをどこまで見るか）
Acquisition タブ	Scan parameters	Total Cycle time	0.5
		Max Dwell Time	0.05
		Inter Scan Delay	0.1
		Inter channel Delay	0.05
		Mass span	0
	Ion Mode Switching	Inter mode delay	0.3
	Solvent Delay		off
	Multiple Fragments	Acquire Multiple Fragments	on
		Quantify Multiple Frafgments	on
Tune file タブ	MS optimization		MS
	MSMS optimization		MSMS
	Acquisiton		MRM
Adducts タブ	Negative ion	[M-H]-	on
		[M+CH3COO]-	必要に応じて on
		[M-?]- 1	必要に応じて on
		[M-?]- 2	必要に応じて on
	Positive ion	[M+H]+	on
		[M+Na]+	必要に応じて on
		[M+NH4]+	必要に応じて on
		[M+?]+ 3	必要に応じて on
		[M+?]+ 4	必要に応じて on
		[M+?]+ 5	必要に応じて on
Losses タブ	Disallowed Loss Of	H_2O	on
		CO_2	on
Inlet methods タブ	Optimization LC Method	QuanOptimize_FlowInj w2200 を選択。	
		Injection volume	5 ul
	Acuisition LC Method	QuanOptimize_FlowInj w2200 を選択。	
		Injection volume	5 ul

[File]-[save as]でファイル名をつけて，QuanOptimize メソッドを保存する（図 5)。

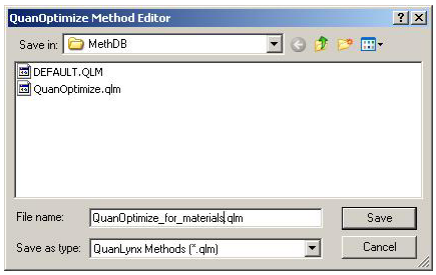


図 5 QuanOptimize メソッドファイルの保存

③Compound Sample List ファイルの作成

分析対象となる標準物質の名前，質量数などの情報を記入します。MassLynx メイン画面の[File]-[New]を選択する（図 6-A)。MassLynx メイン画面の Sample-Format-Load をクリックし（図 6-B)，Compound を選択する（図 6-C)。

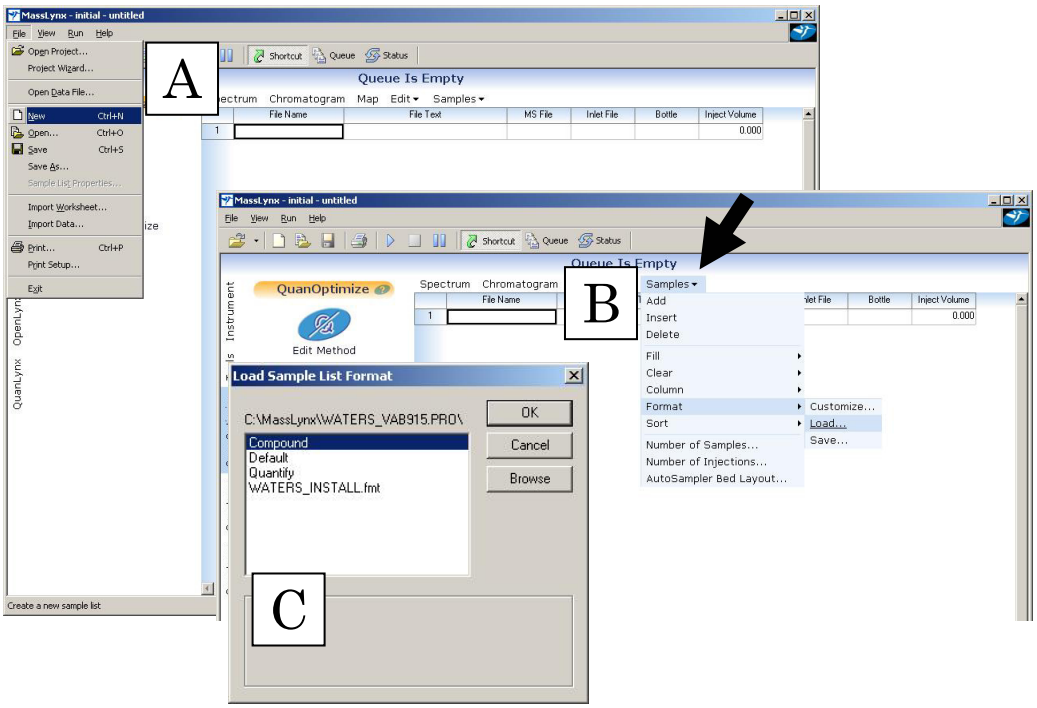


図 6　Compound Sample List ファイルの準備

各行の項目に必要事項を入力します（図 7)。

Compound	物質名を記入してください。
MassA	化学式または質量数を入れてください。化学式を入力すると，分析終了後にこのファイルを再び開いた場合，化学式が質量数に自動的に変換されて表示されます。もし，化学式を確認したい場合は，次のカラムの Sample　group に化学式を入力してください。
Sample group	必要なくても何か入力しておかないと分析が実行できませんので，必ず何か記入してください。複数の物質を分析する場合は，共通の Sample group を記入してください。
Bottle	標準物質が入ったボトルを指定します。ボトルカラムを右クリックし，メニューの最下行の AutoSampler Bed Layout をクリックします。サンプルを入れたプレート番号と各セル番号をクリックして緑色に反転させます。サンプルレイアウト上で右クリックし，Replace を選択すると Bottle カラムにボトル番号が自動入力されます。

QuanOptimize 法では指定した物質の質量数を中心に±5m/z の範囲（H adduct の場合）しか，測定を行いません。質量数が正しく入力されていないと，最適化は正しく行われませんので注意してください。

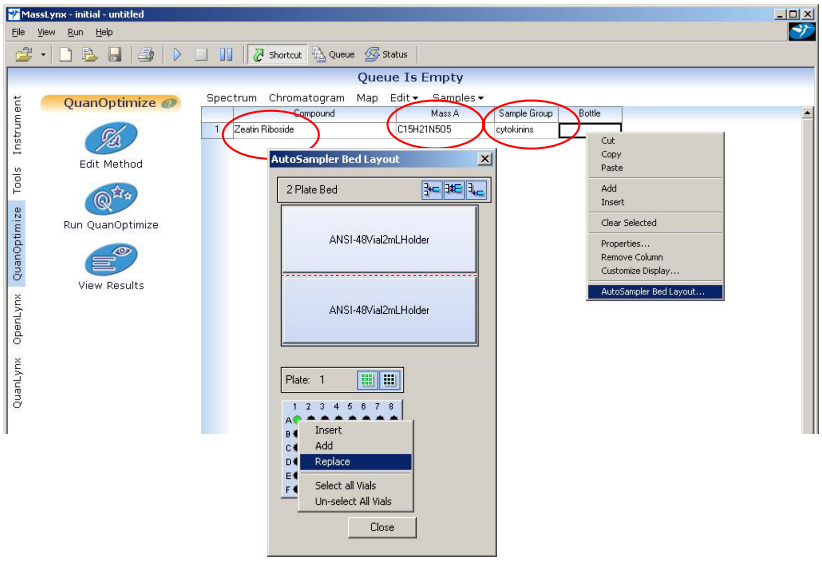


図 7　Compound Sample List ファイルの作成

なお，一つのファイルに複数の物質を指定することも可能です。複数の物質を分析したい場合は，行番号をクリックして，行を黒反転にした後，その上で右クリックするとメニューが表示されるので, Add を選択すると追加する行数を聞いてくるので必要な数を入力して OK を押すと行が追加されます。

以上のように作成した Compound Sample List ファイルを[File]-[Save as]で，ファイル名を指定して保存してください。

④QuanOptimize の実行

Compound を開き，[File]-[Open]とし対象の Compound list を選択します。

MassLynx メイン画面の①Shortcut，②QuanOptimize，③Run Quan Optimize をクリックし，QuanOptimize Wizard を立ち上げます（図 8）。

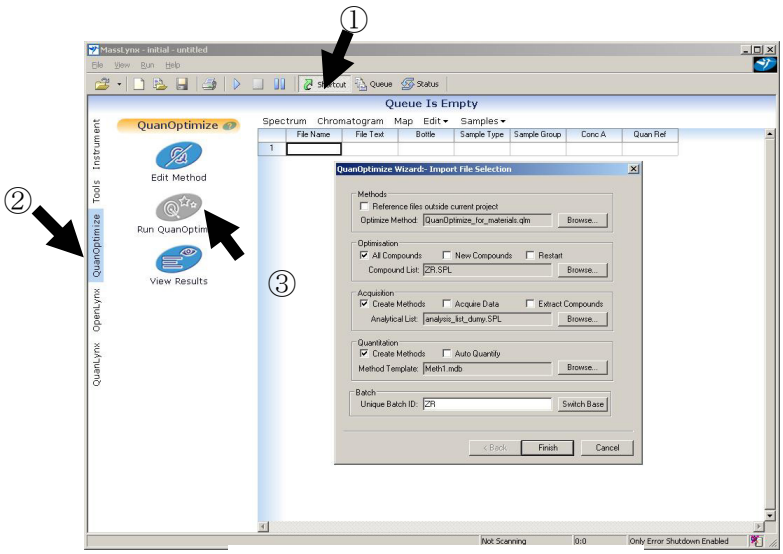


図 8　QuanOptimize の実行

次の２点についてもう一度確認してください。

（１）MS 本体の Inject ボタンを押し，LC から MS に溶媒が供給されているか。

（２）MS tune 画面で，MS tune ファイル：MSMS.ipr が読み込まれているか。

すべての項目を以下の表 2 にしたがって指定します。

表 2　QuanOptimize Wizard の実行パラメーター

Method	Reference files outside current project	off
	Optimize Method	自分が作ったものをブラウズして指定 （例 QuanOptimize_for_materials.qlm）
Optimisation	All compounds	On
	Compound list	自分で作ったコンパウンドリストを指定 （例 ZR.SPL）
Acquisition	Create Methods	On
	Analytical List	自分で作成した Compound list を読み込む。
Quantiation	Create Methods	On
	Method Tempelate	Meth1.mdb をブラウズして指定
	Auto Quantify	off
Batch	Unique Batch ID	指定のままで OK

Finish ボタンを押します。Finish ボタンを押すとサンプルマネージャーから標準物質がイ

ンジェクトされ，設定にしたがって測定が実行されます。

QuanOptimize が実行されるとサンプルの 1 番から終わりまで，目的物質の質量数±5m/z のプリカーサイオン（MS1）の最適生成条件を自動的にサーチします。これが終了したら，もう一度サンプル 1 番からインジェクトが再開され，各サンプルのプロダクトイオン（MS2）を検索します。したがって，１つのサンプルにつき，２回のインジェクションが行われ，これらのクロマトグラムは MS1 と MS2 が別々のファイルとして保存されます。ファイル名には Compound Sample List 中の Compound 名が使われ，プリカーサイオンの測定結果は，Compound 名+(cv)，プロダクトイオンの測定結果は Compound 名+(ce)というファイル名で保存されます。なお, Compound 名に付加される cv と ce はそれぞれ **C**orn **V**oltage と **C**ollision **E**nergy の頭文字です。最適化を複数回実行する場合は，新しい情報が古いファイルに上書きされ，前回のクロマトグラムは見られなくなります。古いクロマトグラムも保存したい場合は, 分析を実行する前に Compound Sample List 中の Compound 名の末尾に番号（例 Zeatine Riboside1）をつけるなどして，クロマトグラムが上書きされることを避けてください。

⑤処理中のクロマトグラムの表示

分析中または分析が終了したコンパウンドリストの表示対象の化合物の行番号をクリックして，行全体を黒反転させます（図 9-A)。この状態で①Chromatogram をクリックすると選択した行に対応したクロマトグラムが表示されます（図 9-B)。

分析中にリアルタイムでクロマトグラムが表示されない場合は，クロマトグラム表示画面の矢印で示した②ストップウオッチアイコンを押してください。また，クロマトグラムの一部を拡大してしまった場合は，③全体表示アイコンを押すと，クロマトグラム全体が表示されます。

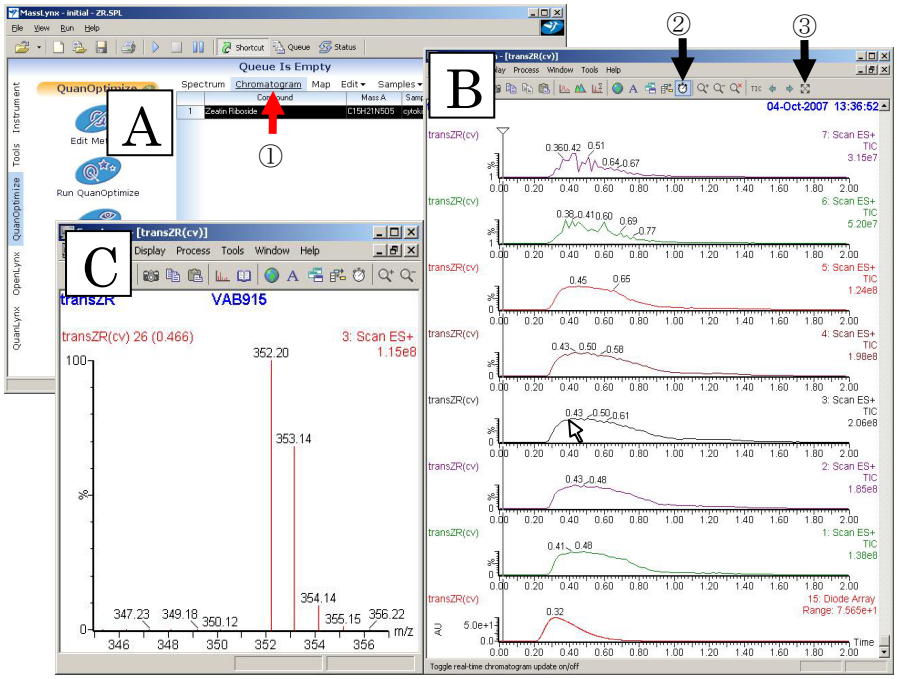


図 9　クロマトグラムとマススペクトルの表示

カラムを接続しないフローインジェクション法によって分析を行っていますので，ピークが非常にブロードになっています。図 9-B のクロマトグラムでは，最下段に PDA による検出結果，それより上段が MS 1 によるプリカーサイオンの検出結果が示されています。MS の各クロマトグラムは，MS 1 を異なるコーン電圧で作動させ，検出したプリカーサイオンのトータルイオン強度(TIC)を示します。

この例では 7 段階の異なるコーン電圧で測定されているので，7 つの MS クロマトグラムが表示されています。クロマトグラムの右に明記されている 1：Scan ES+ TIC 1.38e8，2: Scan ES+ TIC 1.85e8 などのテキストは，コーン電圧の測定開始番号：イオン化モードと極性，観測イオンの種類と強度の順で表示されます。したがって，1：ES+ TIC 1.38e8 はコーン電圧の測定開始番号が 1 番で，エレクトロスプレー法によりポジティブイオンを測定し，トータルイオンの強度が 1.38e8 であることを示しています。この測定例の場合に最も感度が高いのは測定開始番号 3 番の条件（3:Scan ES+TIC 2.06e8）であることが分かります。クロマトグラムにはコーン電圧の測定開始番号しか表示されていないので，この画面では最適なコーン電圧がどのくらいかは分かりません。マススペクトルを表示したい場合は，表示させ

たいクロマトグラムをマウスでクリックしてアクティブにし，ピークをダブルクリックすると，マススペクトルが表示されます（図 9-C）。この例では，ZR のベースピークは，352.2[M+H]⁺として観測されました。

MS2 の分析が進むと自動的にプロダクトイオンの測定画面に切り替わります。現在表示されているファイルがプリカーサイオンを示すのか，プロダクトイオンを示すのかはファイル名に(cv)または(ce)が付いているか，各クロマトグラムの左に表示されているコンパウンド名に(cv)または(ce)が付いているかで判断できます。MS2 で測定されるプロダクトイオンはプリカーサイオンと表 1 の Optimisation タブ-Fragment Size-Minimum で指定した数値の範囲でスキャンを行います。MS2 においても図 9 と同様の操作を行うことにより，マススペクトルを表示することが出来ます(図 10)。MS2 ではプリカーサイオン 352.2 のみを対象として，分析を行っています。コリジョンエナジーが異なると，得られるマススペクトルも異なります。

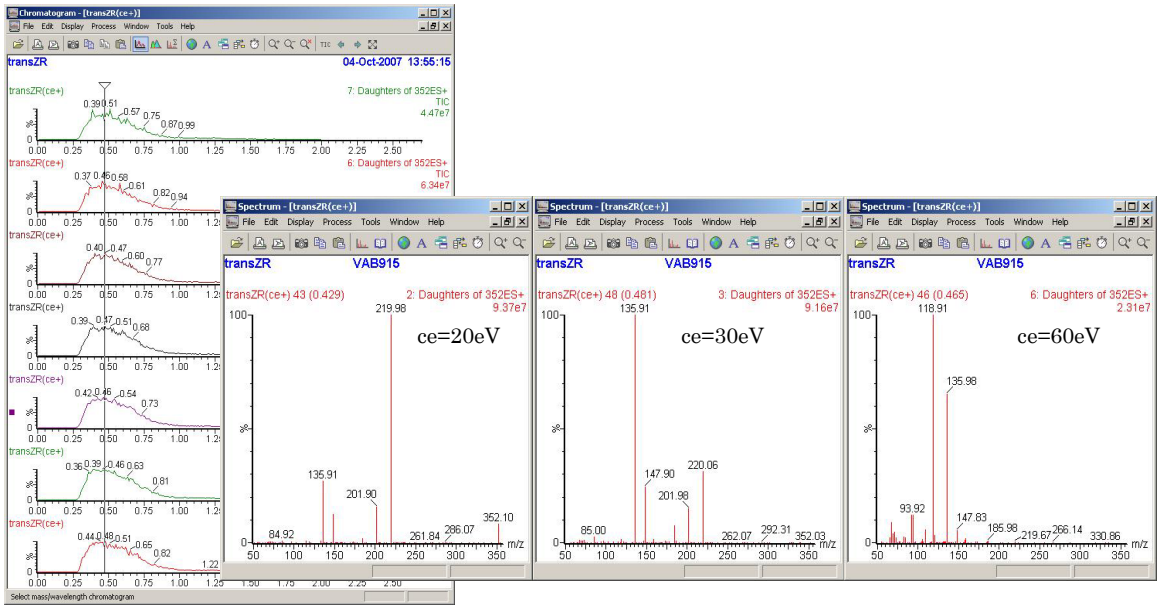


図 10　プロダクトイオンのマススペクトル

最終結果は，Masslynx メイン画面の①Shortcut，②QuanOpimize，③View results をクリックすると結果がテキストファイルで表示されるので(図 11)，これを印刷してください。この例では下から４行目から最適条件が記述されています。

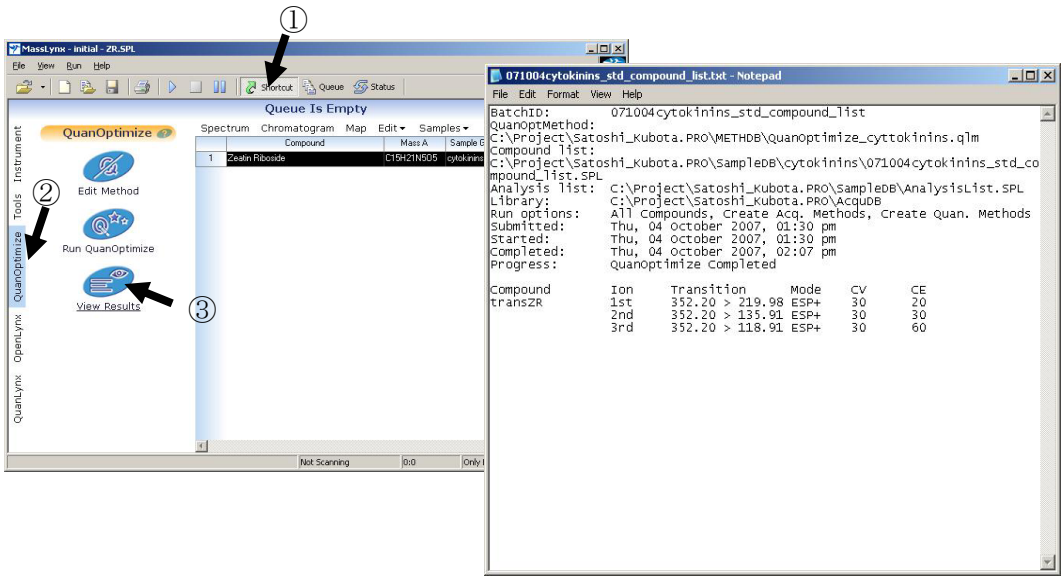


図 11QuanOptimize の結果

図 11 の例では，QuanOptimize method 内（ｐ6 表 1）で Multiple Fragments の項目を３と指定しているので，３つのプロダクトイオンの最適化条件が表示されています。最も感度が高い順番に表示され，この場合最も感度が高いプリカーサイオンとプロダクトイオンの組み合わせは，352.20>219.98 であり，これを測定するモードはエレクトロスプレー法によりポジティブイオンをモニターし，コーン電圧(cv)は 30V，コリジョンエナジー(ce)は 20eV であるということが分かりました。

QuanOptimize 法ではコーン電圧とコリジョンエナジーを最大で８段階しか設定できません(表 1)。そのため，コーン電圧とコリジョンエナジーの設定値の範囲が広すぎる場合，得られた値が必ずしも最適であるとは限りません。したがって，２回以上 QuanOptimize を実行することをお勧めします。１回目の QuanOptimize ではコーン電圧とコリジョンエナジーともに，設定値の範囲を広くとって実行し，概ねどの程度の範囲で感度が高くなるかを見つけます。そして，得られた値を中心にコーン電圧とコリジョンエナジーの範囲を狭めて指定しなおし，再度 QuanOptimize を実行すれば，より最適値に近い条件が得られるでしょう。

⑥MS 分析メソッド(MS file)の確認と作成

p 10 表 2 の Optimisation-All compounds が on になっている場合は，C:¥MassLynx¥(プロジェクト名).pro¥ACQUDB フォルダ内に，“MSMS_(化合物名)”および“MSMS_(Compound sample list 名)_Sample Group 名”という名前が付いた MS file が自動生成されます。この例では化合物名が Zeatin Riboside，Compound sample list 名が ZR でしたので，MSMS_ZeatinRiboside と MSMS_ZR_CYTOKININS というファイルが作成されます。ここでは，一つの物質しか取り扱っていないので MSMS_ZeatinRiboside と MSMS_ZR_ CYTOKININS の内容は同じですが，複数の化合物を Compound Sample List に記述してあれば，MSMS_ ZR_ CYTOKININS にはすべての化合物の最適条件が記述されています。

自動生成された MS file の内容を確認するには，MassLynx メイン画面の①Status，左端の MS ②Method をクリックし(図 12-A)，メッソッド編集画面から[File]-[Open]で対象ファイルを読み込みます(図 12-B)。図 12-C の矢印のファンクションをダブルクリックすると，設定内容が確認できます(図 12-D)。

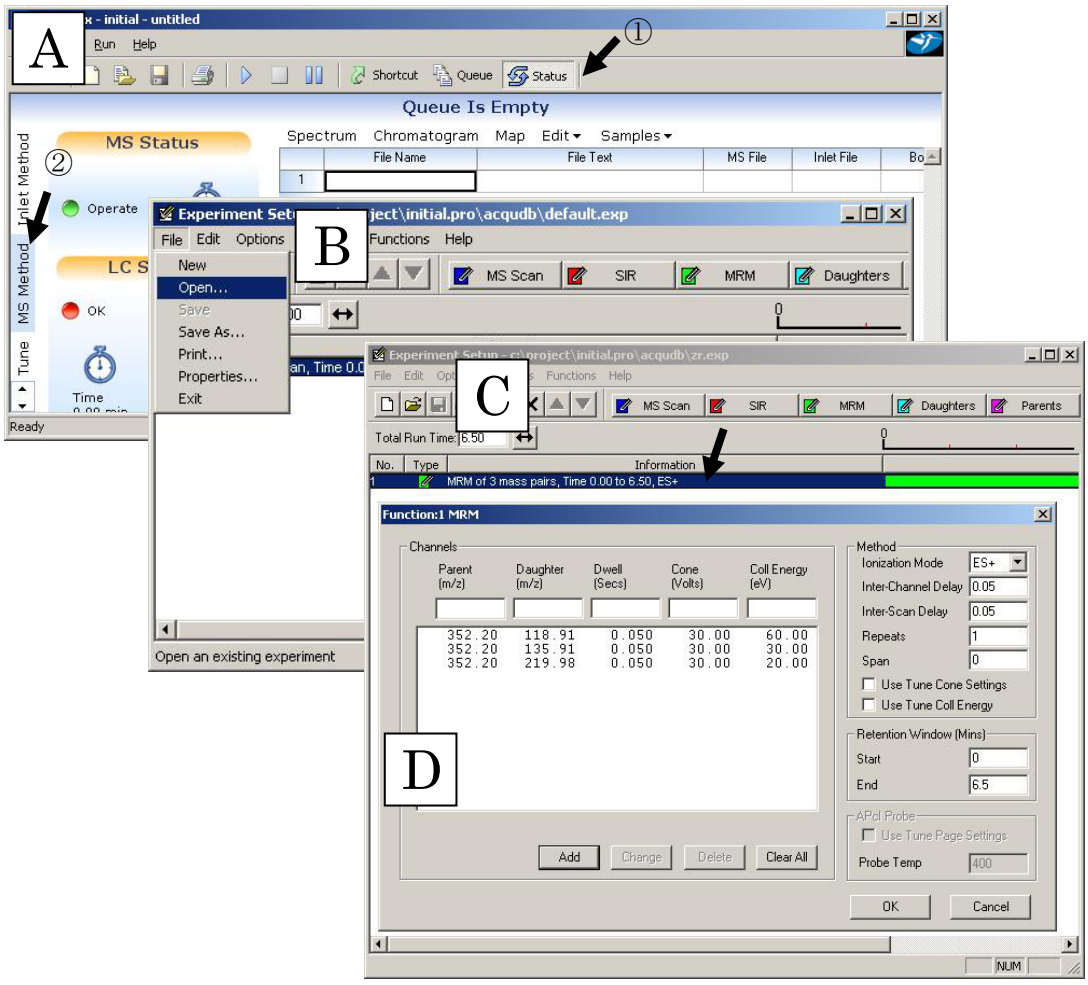


図 12 MS file の確認

⑦MS 分析メソッド(MS file)の新規作成と編集

次に MS file を手動で作成する手順を述べます。新たに MS file を作成したい場合，または自動で作成された MS file を編集したい場合にお読みください。必要なければ次のセクションに移ってください。

MassLynx メイン画面の①Status，②MS Method をクリックし(図 13-A)，メッソッド編集画面を表示させる(図 13-B)。デフォルトでは MS Scan が指定されているので，No1 のラインを選択し，[Edit]-[Delete]でこのラインを削除する(図 13-C)。

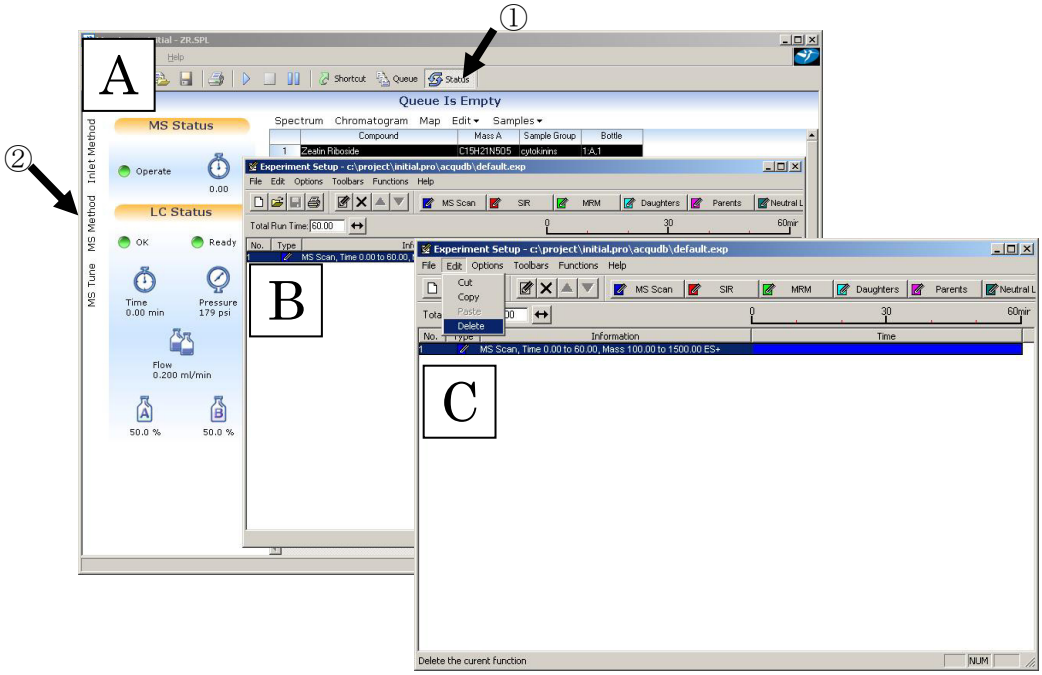


図 13 MS Method Editor の表示

続いて，①MRM アイコンをクリックし，Function 編集画面を表示します（図 14）。Channels には p14 図 11 の QuanOptimize で得られたプリカーサイオン（Parent）とプロダクトイオン(Daughter)の質量数，Dwell，コーン電圧，コリジョンエネルギーなどを設定します。Dwell は 0.05secs を指定してください。

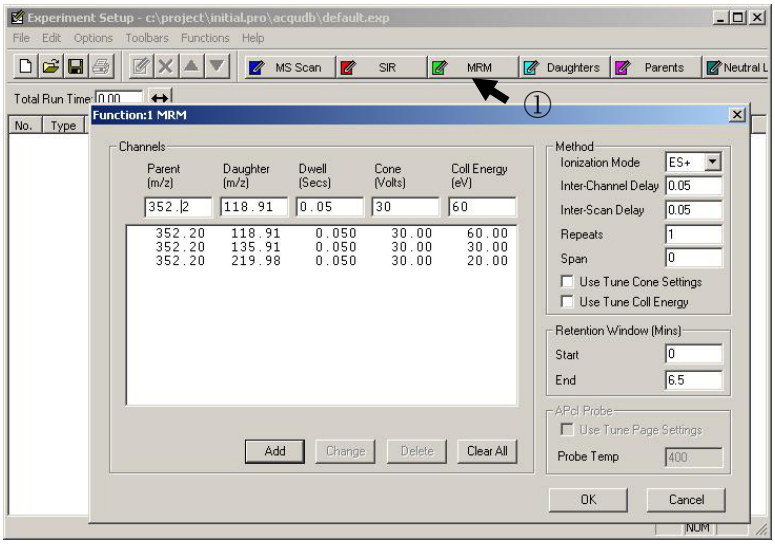


図 14 Function の指定方法

1 チャンネルずつ入力し，完了したら Add ボタンを押します。

これを必要なチャンネル数繰り返します。サンプルに測定対象物質の類縁化合物を多く含む場合，１つのプリカーサイオンとプロダクトイオンの組み合わせ（１チャンネル）だけでは，物質を同定できないことがあり

ますので，複数のチャンネルを指定した方がよいでしょう。

右側にある Method は今回の例ではイオン化法にエレクトロンスプレーを用い，ポジティブイオンを観測するので Ionization Mode のプルダウンメニューで ES+を選択します。

Inter-Channel Delay は 0.05，Inter-Scan Delay は 0.05，Repeats は 1，Span は 0 を指定してください。

Retention Window は，このイオンを観測する時間幅を指定します。通常は LC 分析メッソッドのランタイムと一致させますが，必要ないピークを観測したくない場合は，目的物質のピークが観測される時間幅だけ指定することも出来ます。OK ボタンを押し，確定します。もし複数の物質を対象とするならば，同じ操作を繰り返すことで設定できます。また，今回は定量を行うので MRM だけを指定していますが，その他に MS Scan，SIR，Daughters など異なるファンクションも同時に指定できます。

[File]-[Save as]を選び，ファイル名を指定して MS method ファイルを保存します。

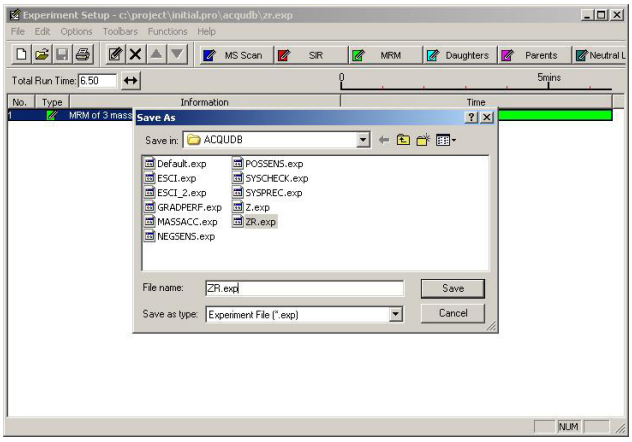


図 15　MS method ファイルの保存

次回同じ分析をする場合は，ここで作成した MS Method ファイルを読み込むだけで分析が出来ます。

3 LC メッソッド(Inlet file) の作成

①ポンプのグラジェント設定

MS 本体の LOAD ボタンを押し，UPLC から MS への溶媒供給を止めます。MassLynx メイン画面の①Status，②Inlet Method をクリックし[LC]- [flow off]を選択して UPLC の送液を止める。

UPLC のカラムオーブンをあけて，パイプを取り外し，分析用カラムを接続します。接続方法は「起動と終了編」を参照してください。

MassLynx の①Status，②Inlet Method をクリックし，Inlet Method 画面を表示させ，③Inlet ボタンをクリックする（図 16)。

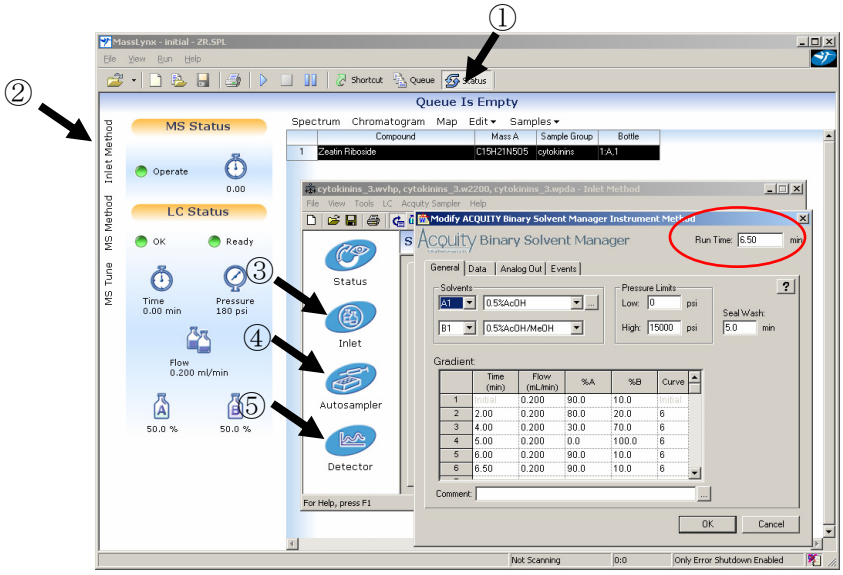


図 16 ポンプの作動条件の設定

General タブをクリックし，使用する移動相が入った流路，時間，ポンプ流速等を指定します。右上の Run time はグラジェント終了時間と同じ時間を入力します。UPLC は従来の HPLC よりもかなり短時間で分析が行えます。目安としては，従来の半分以下のランタイムで十分と思われます。設定が終了したら OK ボタンを押します。

従来使用していた HPLC の設定を UPLC に適用するために，ACQUITY UPLC Columns Calculator というソフトウェアが付属しています。これを利用すれば，UPLC における流速やランタイムなどの値が目安として得られます。詳しくは「定性編」p9 を参照してください。

②オートサンプラーの設定

図 16 の Inlet Method 画面左の④Autosampler ボタンをクリックし，General タブ内の設定を表 3 に従って設定する。

表 3　Autosampler のパラメーター

General タブ	Sample look option	Partial Loop With Needle Overfil	on
	Wash solvent	weak	10/90=ACN/WATER 600ul
		Strong	Acetonitrile 200ul
	LoopOffline		Disable
	Load Ahead		Off
	Temperature	Column	使用温度を入力
		Sample	サンプルの保存温度
	Advance ボタン	Needle OverFill Flush	On 3.0 ul OK
Data タブ	特に使用しない		
Event タブ	特に使用しない		

右上の Run time をポンプのグラジェント終了時間と同じ時間を入力する。

設定が終了したら OK ボタンを押す。

③PDA の設定

図 16 の Inlet Method 画面左の⑤Detector ボタンをクリックし，General タブ内の設定を表 4 にしたがって設定する。

Inlet Method 画面左の Detector ボタンをクリックし，General タブをクリックする。

表 4　Detector のパラメーター

General タブ	Lamp on Enable 3D Range Resolution Sample rate Filter time constant Exposure time	on on 取り込む波長域を指定 1.2 20 Normal Auto
2D channels	特に指定しない	
Analog Out	特に指定しない	
Event	特に指定しない	

右上の Run time をポンプのグラジェント終了時間と同じ時間を入力する。

設定が終了したら OK ボタンを押す。

ポンプのグラジェント設定，オートサンプラーの設定，PDA の設定は Inlet method として保存されます。

Inlet Method 画面の[File]-[Save as]で名前をつけて保存する。次回同じ分析をする場合は，名前をつけたメソッドを指定すれば分析できます。

4 サンプルリストの作成

サンプルリストには検量線に使用する標準物質と測定対象となるサンプルのファイル名，サンプルの説明，利用する MS file と Inlet file，Injection volume などのパラメーターを指定します。

MassLynx メイン画面の[File]-[New]を選択する（図 17-A)。MassLynx メイン画面の Samples-Format-Load をクリックし（図 17-B)，Quantify を選択する（図 17-C)。サンプルリスト画面が定量用フォーマットに変更されます（図 17-D)。

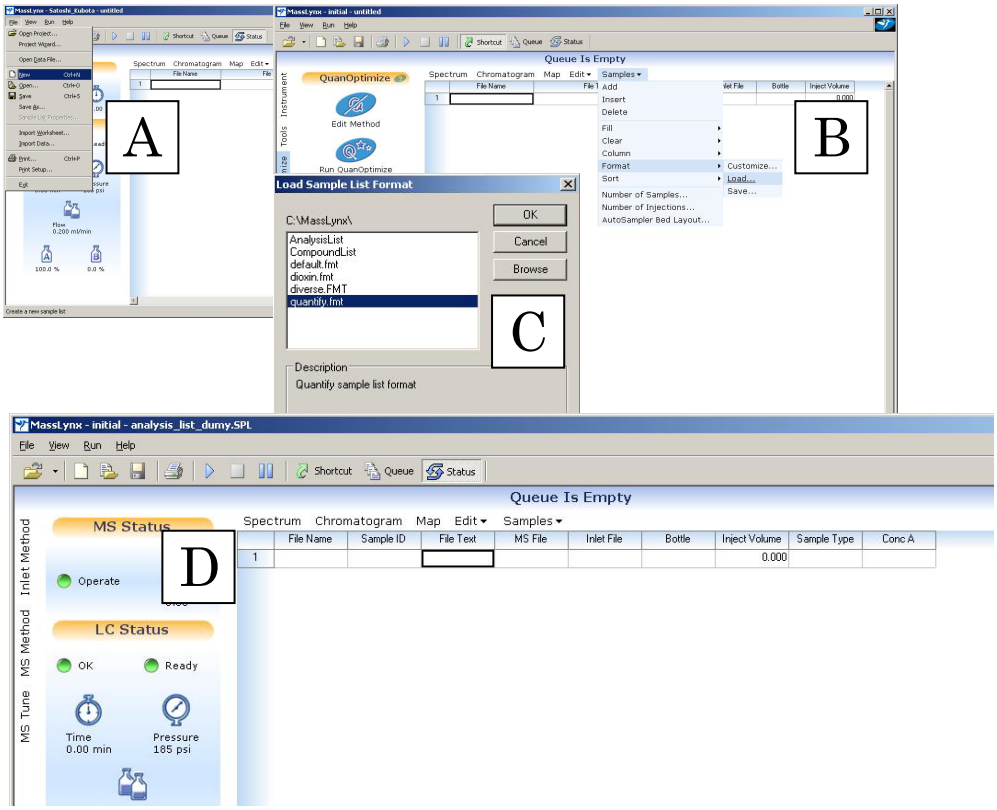


図 17 サンプルリストのフォーマットの読み込

続いて，このリストに必要事項を入力します（図 18)。

１行に１サンプル分の情報を記入します。

File name	サンプルを分析したときのクロマトグラムが保存されるファイル名です。各サンプルに固有のファイル名をつけてください。日付+名前_1 などのフォーマットがよいでしょう。末尾を数値としておくと，行を増やしたときに自動的に末尾の数値も増加するので便利です。
Sample ID	無くてもかまいません。もともと表示されていない場合もあります。
File Text	サンプルの詳細について記述します。無くてもかまいませんが，後でファイルを見たときに分かるようなコメントを書いておくとよいでしょう。
MS File	すでに作成した MS file を指定します。このセルをクリックして，右ボタンをクリックし，Browse を選択して，作成したファイルを指定します。
Inlet File	MS file と同様の操作により，作成した Inlet file を指定します。
Bottle	サンプルバイアルを指定します。設定方法は，p9 図 7 を参照してください。
Injection Volume	サンプルの注入量を指定します。本機では 1～10 μL の範囲で注入可能です。
Sample Type	セルをクリックし，プルダウンメニューから Standard または Analyte を選択します。検量線の標準品の場合は Standard，測定対象サンプルの場合は Analyte とします。
Conc A	検量線に用いる標準品の濃度を入力します。単位は別途指定しますので，ここでは数値のみ入力します。サンプルの場合には数値は入力しません。

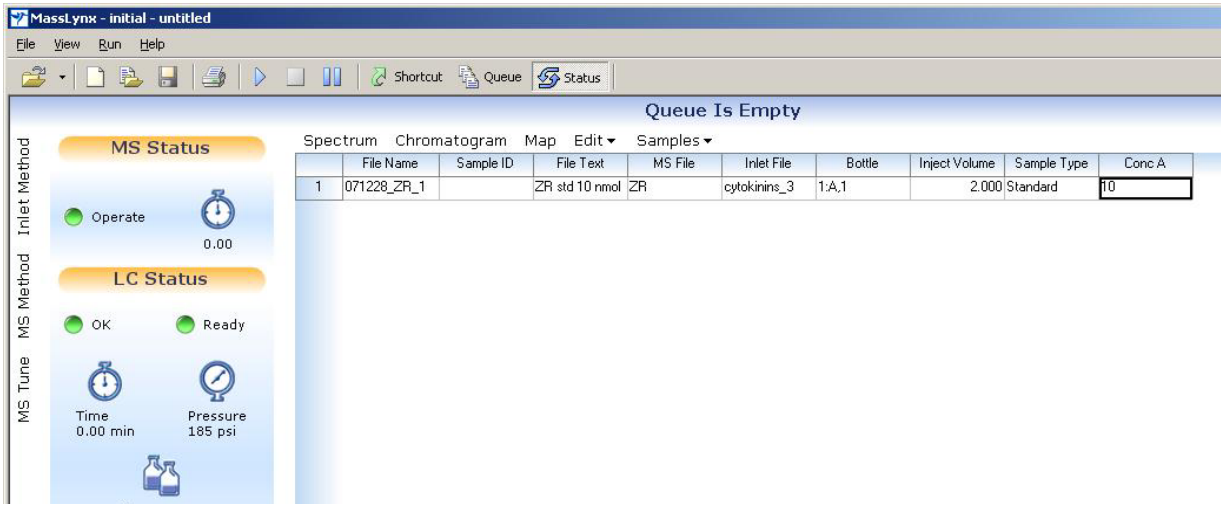


図 18 定量用サンプルリストの作成

サンプルの追加は以下のように行います。行番号 1 をクリックし，セル内で右クリックするとポップアップメニューが現れるので[Add]を選択します（図 19-A)。続いて，追加するサンプル数を入力して OK ボタンを押します（図 19-B)。すると図 19-C のように 10 行追加されています。このとき，File Name は末尾に数値があると自動的に 1 つずつ増加した番号が振られ，Bottle もボトル番号が自動的に 1 つずつ増加して振られます。File text，Inject Volume，Sample type，Conc A は行番号 1 の内容がそのままコピーされるので，それぞれ固有のテキストまたは数値を入力してください(図 19-D)。この例では 6 行目までが検量線の標準試料，7 行目以降は分析用サンプルとなっています。標準試料と分析用サンプルでは Sample type が異なりますので，注意してください。

[File]-[Save As…]で，Sample list を保存する。

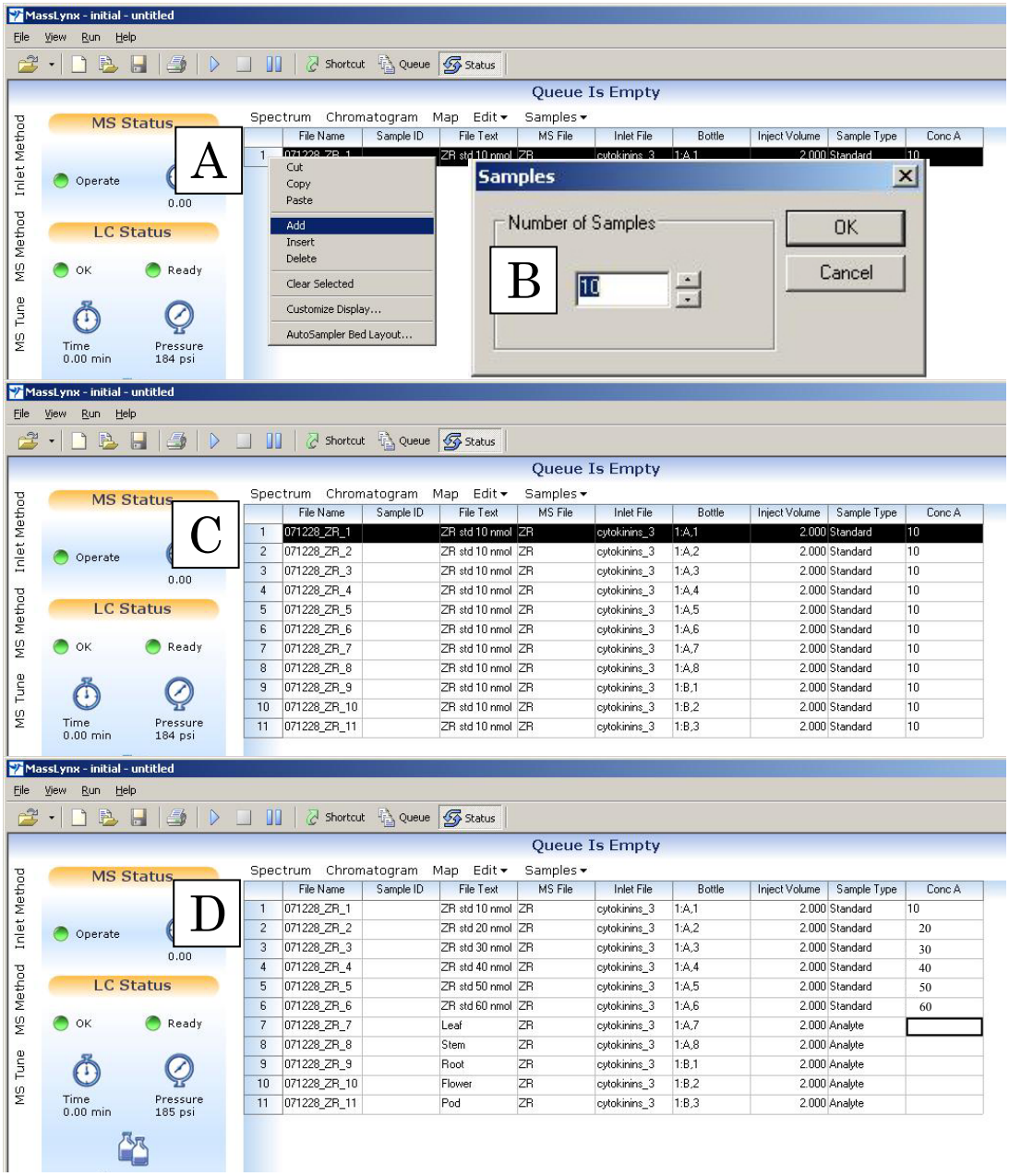


図 19 定量用サンプルリストの追加

なお，1 サンプルに対して複数の化合物を同時定量したい場合は，サンプルリストに化合

物の種類の数だけ Conc B, Conc C・・と，濃度を記入するカラムを追加する必要があります。サンプルリストにカラムを追加するには， Samples – Format – Customize を選択し，Customize Field Display メニューから Conc B と Conc C にチェックを入れて，OK を押せばサンプルリストに Conc B と Conc C カラムが追加されます。

また，MS file にも各化合物に対するファンクションを追加しておく必要があります。

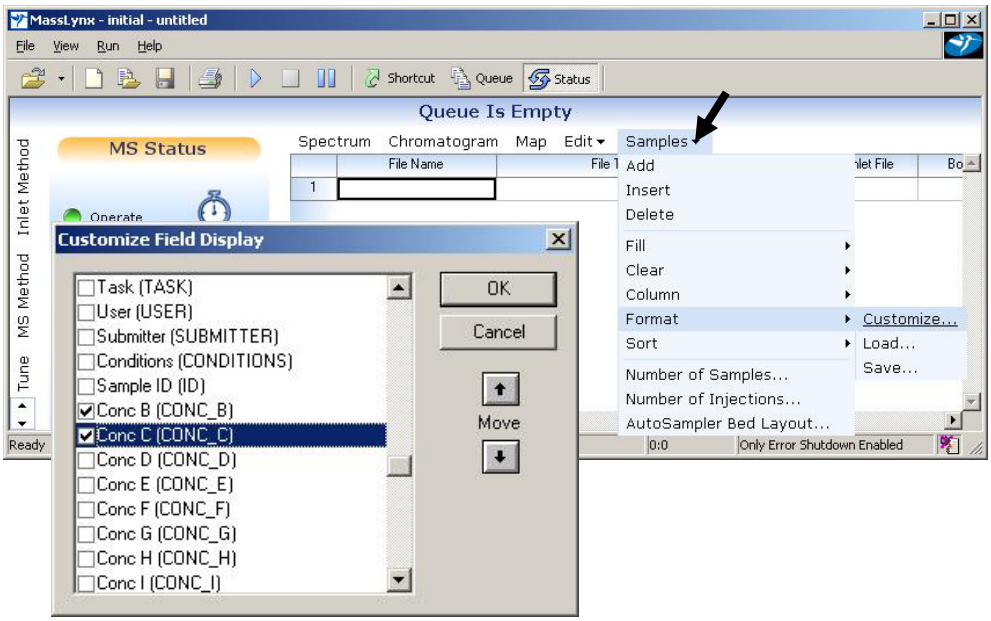


図 20 サンプルリストのフォーマットの変更方法

５ 分析の実行

分析を実行する前に次のことを確認してください。

① UPLC に分析用カラムが取り付けてあるか。

② UPLC が当該 inlet method の初期溶媒の組成で送液されているか，カラム温度とサンプル温度が inlet method と同じ設定になっているか確認してください。分析前の UPLC の動作条件が inlet method の内容と一致していないと，分析を実行した時点で初めて inlet method の条件になるため，カラムが平衡化されず，正しい結果が得られません。

③ MS 本体の Inject ボタンを押し，UPLC から MS へ移動相を供給する。

④ MS tune 画面から[File]-[Open]として，MRM.ipr を読み込みます。QuanOptimize の実行時には MSMS.ipr が読み込まれているので，変更してください。

⑤ Inlet file と MS file を開き，各機器の Run time が一致しているか確認してください。一致していないと，途中で測定が終了してしまうなどの不具合が出ます。

行番号をマウスでドラッグし，分析を実行したい行を黒反転にします(図 21)。そして，①実行アイコンを押すと，分析が実行されます。１行だけ黒反転にすれば，その行だけ実行できます。

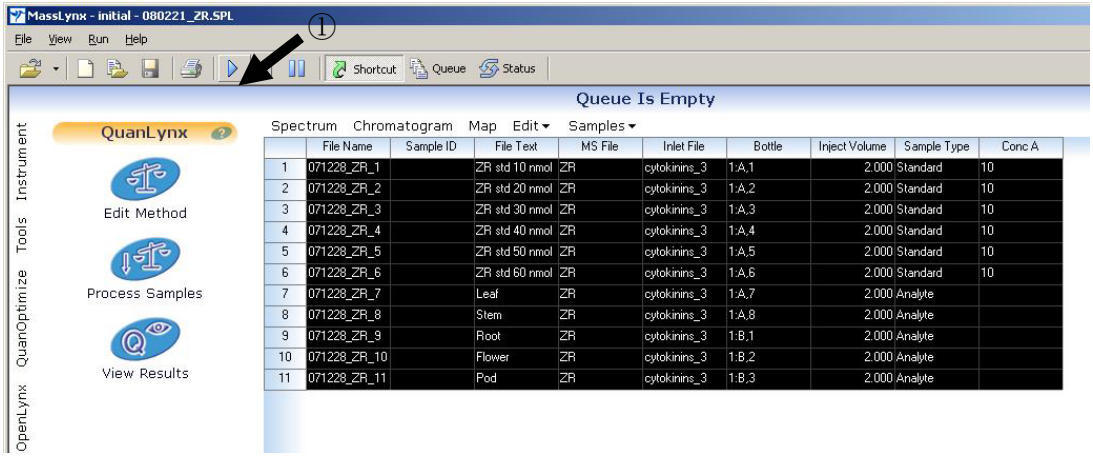


図 21　分析の実行

分析終了後，再び特定行のみを分析する場合，上記の操作を繰り返せば可能です。しかし，ファイル名が同じであるため，前回の分析ファイルが上書きされます。また，一度実行してから，サンプルリスト上で File name を変更すると，実際の分析ファイルとのリンクが切れてしまい，サンプルリスト上からそのクロマトグラムを参照することが出来なくなってしまいます（正しくもとのファイル名に書き戻せば参照できます)。したがって，もし同一サンプルを再分析したい場合は，p22 図 19-A の手順で該当する行を Add ではなく Copy し，最終行に Paste して，File Name を変更後，当該サンプルを分析するようにしてください。リストの行は増えますが，上記のような問題は発生しません。なお，サンプルリスト上で行を削除またはファイル名を変更しても，クロマトグラムが記録されているファイル自体は何も変更されません。あくまでもリストが変更されるだけです。以上の操作により，標準物質とサンプルの分析が実行されます。

クロマトグラムを確認するには，サンプルリストの当該サンプルの行番号を選び，①Chromatogram をクリックします（図 22-A)。すると TIC のクロマトグラムが表示されるので，この画面で[Display]-[Mass]を選択し（図 22-B)，Mass Chromatogram 選択画面を表示させます（図 22-C)。この中で Channels に表示されているチャンネルをダブルクリックすると，Description(chan)に選択したチャンネル番号が自動的に入力されます。複数のチャンネルを同時に表示させたい場合は，該当チャンネルについて同様の操作を行います。最後に OK ボタンを押すと，TIC に加えて３つのチャンネルのクロマトグラムが表示されます（図 22-D)。

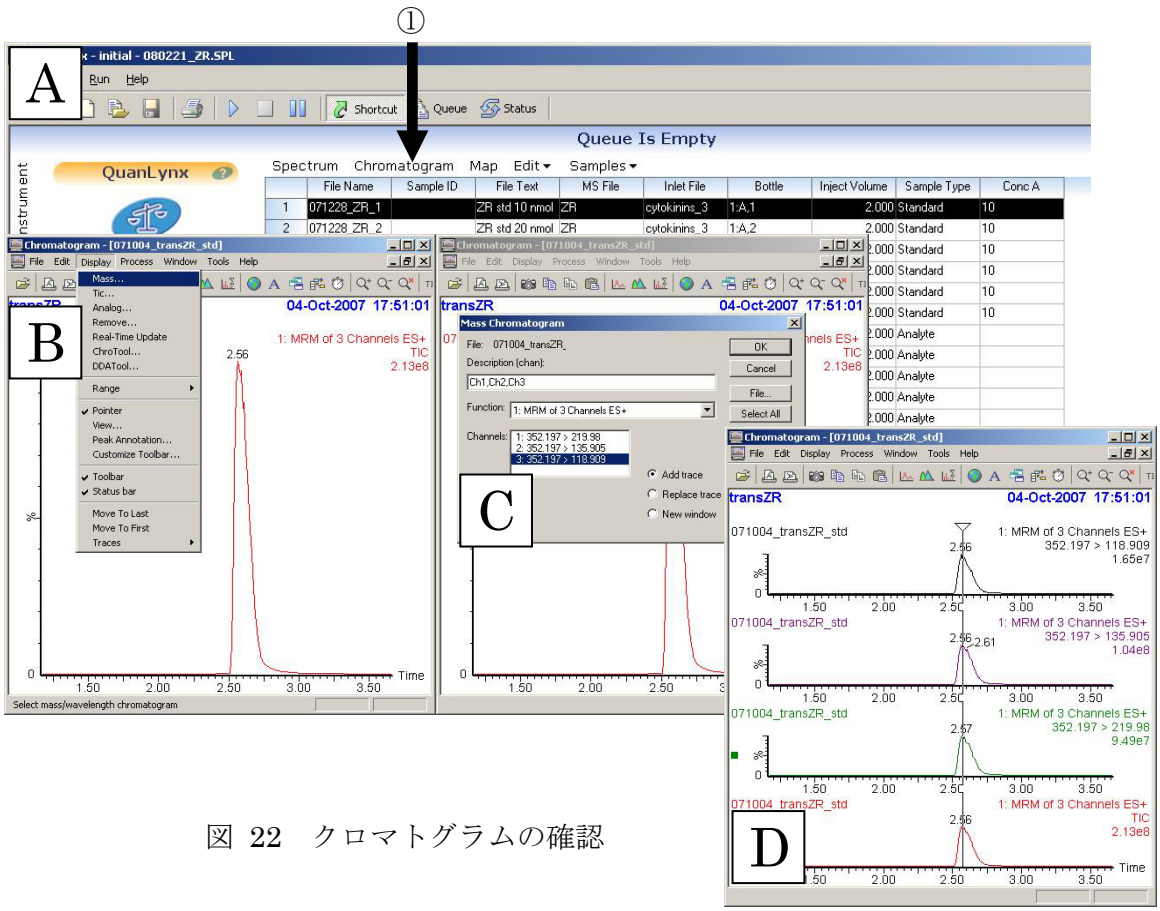


図 22　クロマトグラムの確認

6 定量メソッドの作成

Masslynx メイン画面の①Shortcut，②QuanLynx，③Edit Method の順序でクリックし，QuanLinx Method Editor を起動します（図 23-A）。QuanLinx Method Editor で[File]-[new]を選択し，新しい定量メソッドファイルを作成してください（図 23-B)。この画面で[Compound]-[Add]を選択して(図 23-C)， Compound List 中に New compound を表示させます。④Compound properties アイコンをクリックし(図 23-D)，Compound Properties Page を表示させ, Properties 領域に表示されている Compound Name に物質名（例では ZR）を入力します。物質名は半角英数のみ使用可能で，スペースとピリオドは使えません。

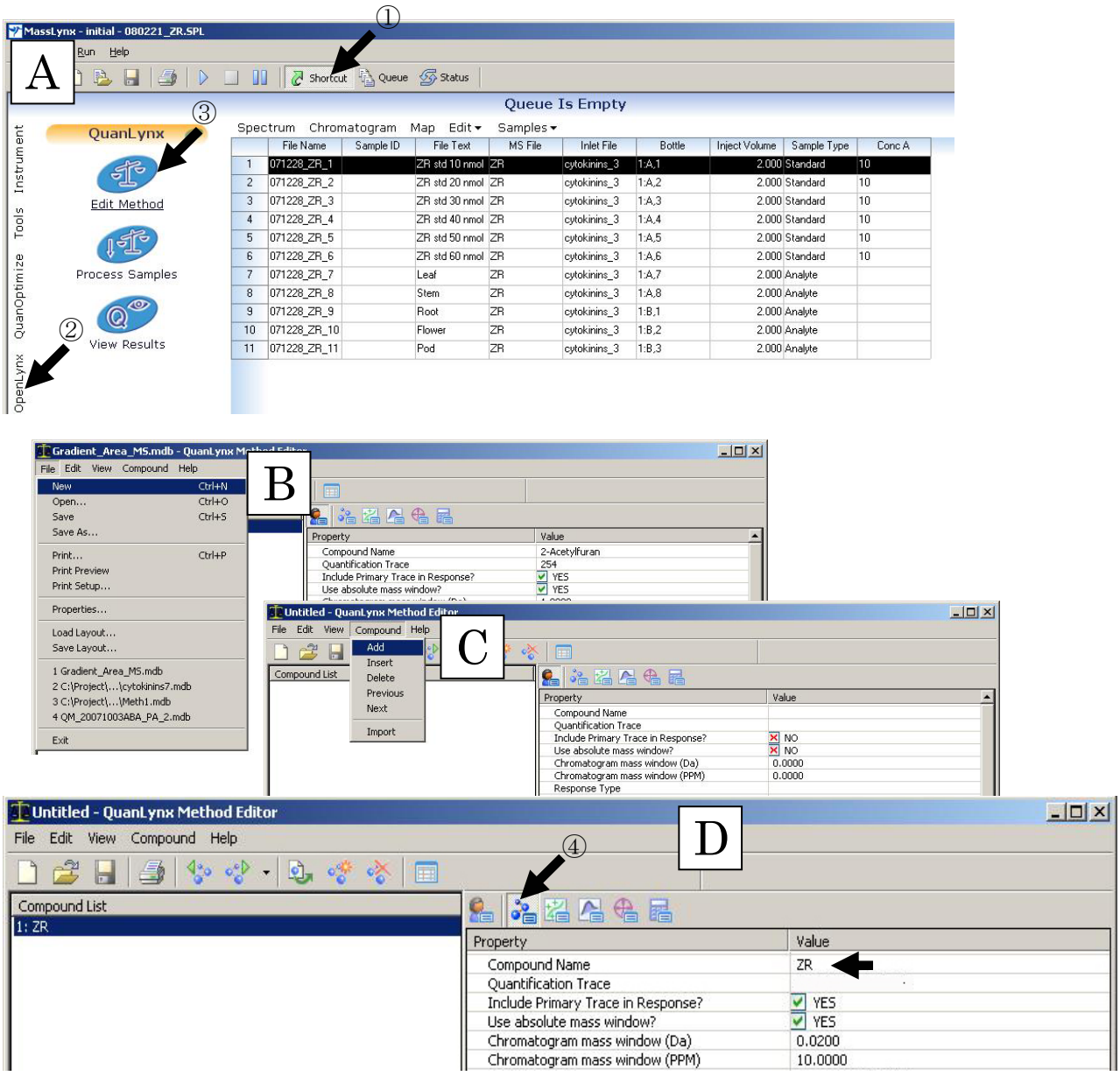


図 23 定量メッソッドファイルの新規作成

①Compound property の設定

続いて，各 Property に対する値を設定します。2 行目の Quantification Trace は定量に使用するマスを入力します（図 24-A)。TIC のほか，QuanOptimize で得られたプリカーサイオンとプロダクトイオンの組み合わせから 1 つだけ選択できます。一般には，最も感度が高いイオンの組み合わせを設定します。手動で入力するのではなく，まずは Quantification Trace の Value 欄のセルをクリックし，カーソルをアクティブにしておきます（図 24-A)。続いて，p 24 図 22 の方法でクロマトグラムを表示させ，用いたいイオンの組み合わせのクロマトグラムをクリックして，さらにそのピークトップで右クリックをします(図 24-B)。すると，Quantification Trace に分子イオンが，Predicted Retention Time にリテンションタイムが自動的に入力されます(図 24-C)。設定に失敗した場合は，数値を削除してから再度同じ操作を行ってください。

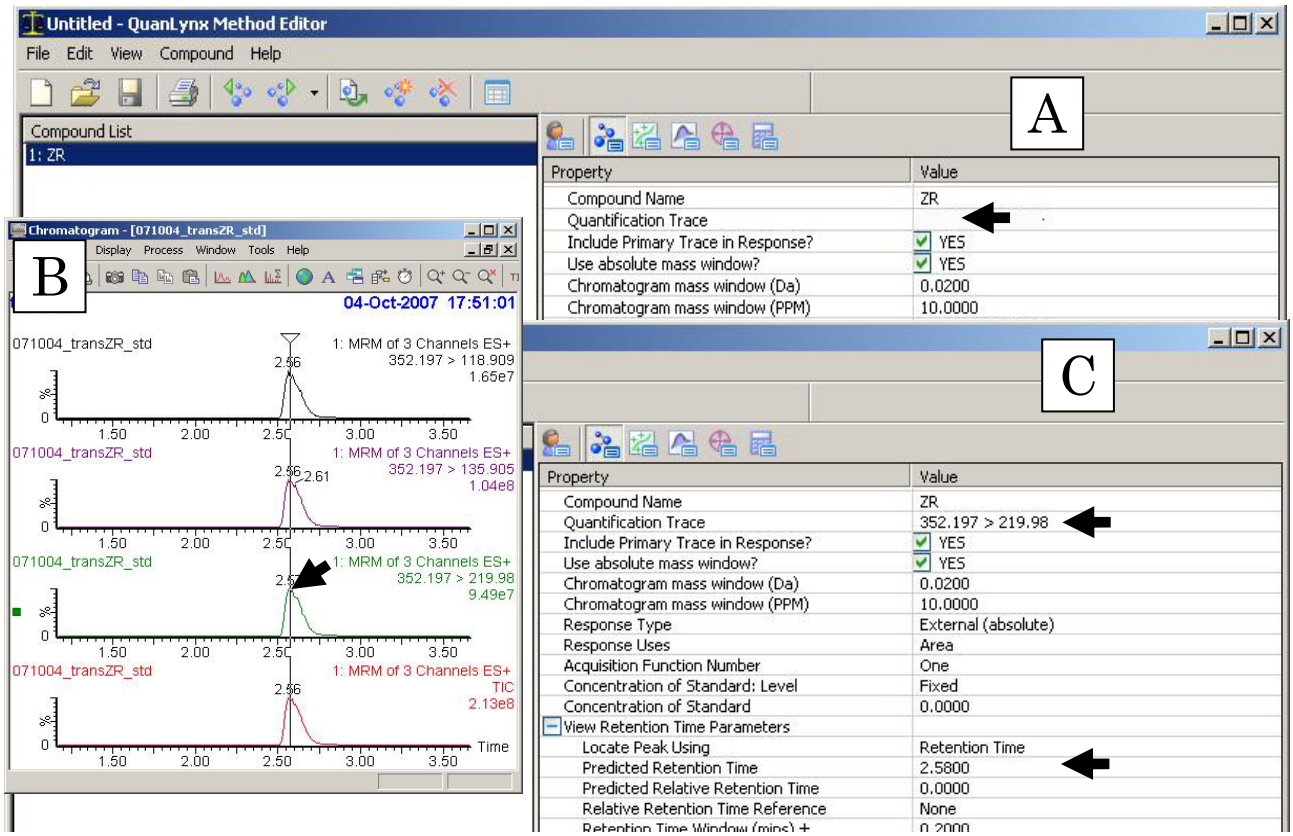


図 24　Quantification Trace と Predicted Retention Time の設定

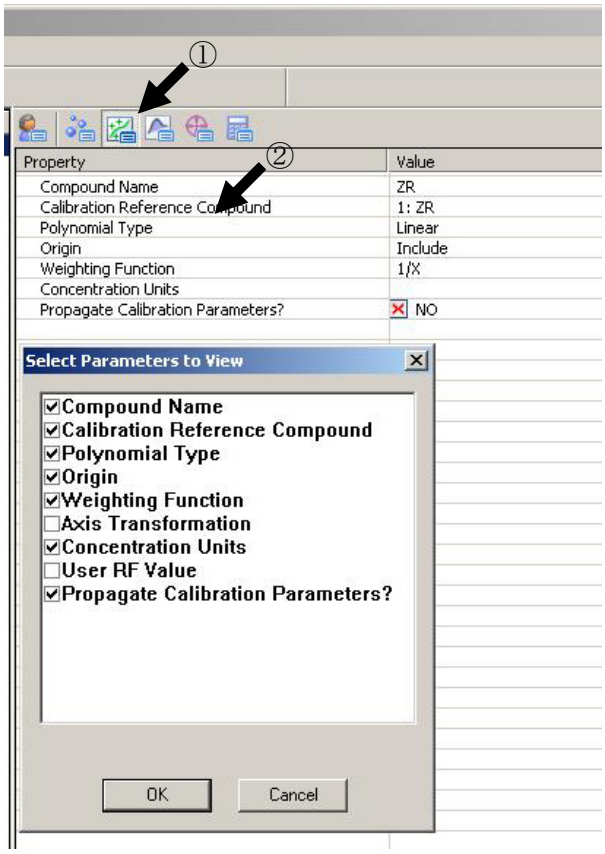
その他のパラメーターは以下の様に設定してください。

Include Primary Trace in Response :	YES
Use absolute mass window?	YES
Chromatogram mass window(Da)	0.02000
Chromatogram mass window(PPM)	10.0000
Response type:	External (absolute)：外部標準法の場合 Internal:内部標準法の場合
Response use:	Area
Acquisition Function Number	One
Concentration of Standard:Level	サンプルリストの標準物質の濃度を記入したカラムの名前をプルダウンメニューで指定します。例：Conc A
Concentration of Standard	0.0000
Retention time window(min)?	1.0000

②検量線関連パラメーターの編集

①Calibration Properties アイコンをクリックする。初期設定ではすべてのパラメーターが表示されているので，画面の②Property 領域で右クリックして，Select Parameters to View を表示させ，以下のパラメーターだけにチェックを入れる。

Compound Name
Calibration Reference Compound
Polynomial Type
Origin
Weighting Function
Concentration Units
Propagate Calibration Parameters?
OK ボタンを押す。



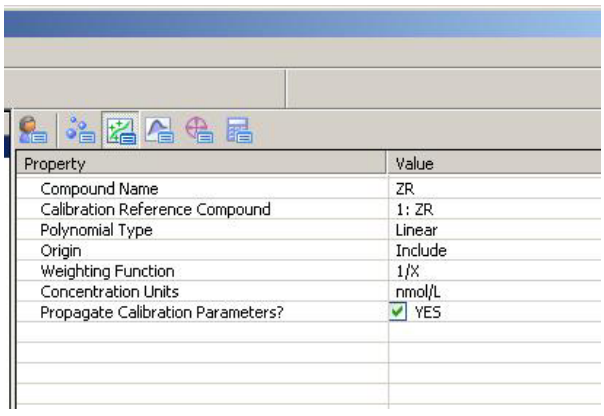


図 25　検量線関連パラメーターの設定

各 Property の値は以下のように設定する。

Calibration Reference Compound	ドロップダウンリストからキャリブレーションに使用する化合物を選択する。
Polynamial Type	直線回帰の場合は Linear を選択する。
Origin	検量線の原点を通すか通さないかを選択する。 原点もデータのひとつとみなす場合：Include 無視する場合：Exclude 強制通過場合：Force
Weighting Function	重み付けの方法を選択する。
Concentration Units	測定単位を入力する。
Propagate Calibration Parameters?	化合物を追加登録して同時に定量する場合，これを Yes にしておくと，このページでの変更が他の化合物にも反映される。

③波形解析パラメーターの編集

①Integrated Properties アイコンをクリックする。初期設定ではすべてのパラメーターが表示されているので，画面の②Property 領域で右クリックして，Select Parameters to View を表示させ，以下のパラメーターだけにチェックを入れる。

Compound Name
Smoothing Enable?
View Smooth Parameters
Apex Track Enable?
View Threshold Parameters
Integration Window Extent
Propagate Integration Parameters?

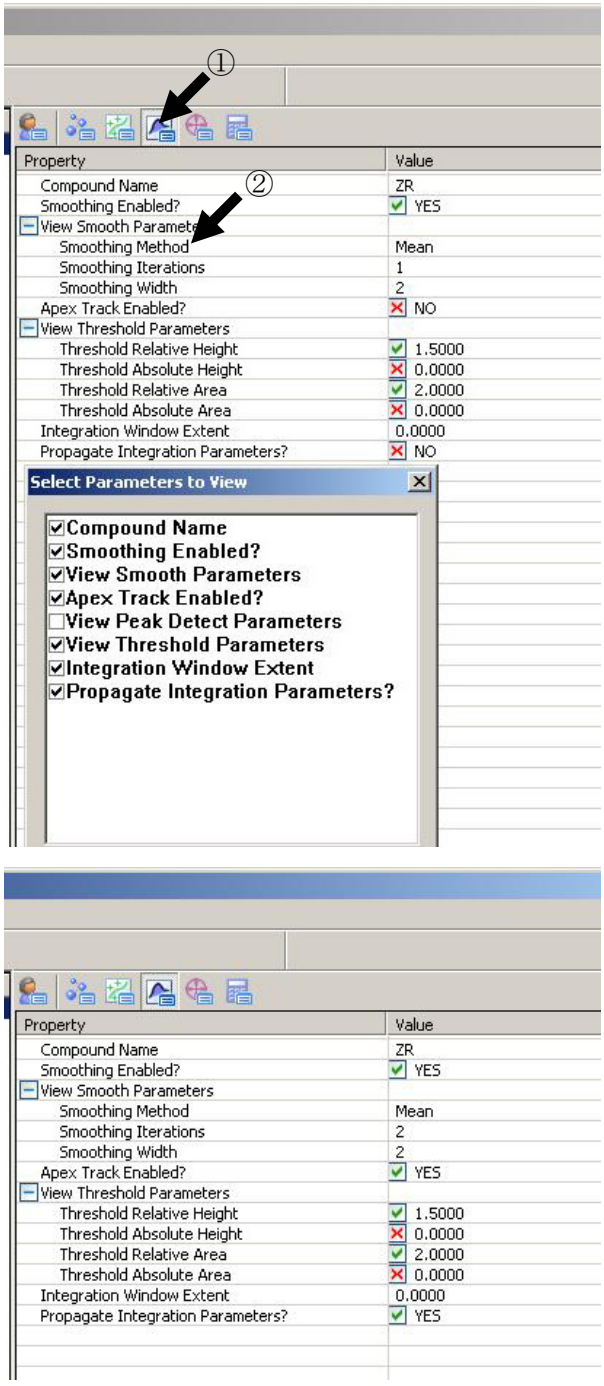


図 26　波形解析パラメーターの設定

各 Property の値は以下のように設定する。

Smoothing Enable?	Yes スムージングを行うことにより，ノイズが除去され，定量性が向上しますが，設定によっては２つの隣り合ったピークが１つのピークに統合されてしまうことがあります。使用に当たっては，この点についてご留意ください。
+View Smooth Parameters	+をクリックしパラメーターの内容を表示させる。
Smooth method	Mean を選択
Smoothing Interations [注]	スムージング回数を指定：2 を推奨。
Smoothing Width	スムージングする範囲を指定：2 を推奨。
Apex Track Enable?	Yes
+View Threshold Parameters	+をクリックしパラメーターの内容を表示させる。
Threshold Relative Height	1.5000
Threshold Absolute Height	0.0000
Threshold Relative Area	2.0000
Threshold Absolute Area	0.0000
Integration Window Extent	0.0000
Propagate Integration Parameters?	Yes

以上で定量メソッドファイルが作成できました。[File]-[Save as]でファイル名を指定して保存してください。

[注] Waters の推奨値は２ですが，隣り合った２つのピークが１つに統合されてしまうことがあります。その場合は，Smoothing Width も含め両方とも１にするか，スムージングを行わないようにするとよいでしょう。これらのパラメーターは生クロマトグラムと波形処理後のクロマトグラムを見比べて判断してください。

7 定量メッソッドの実行と結果の表示

分析を実行した定量用サンプルリストを開きます。検量線の行と定量を行いたいサンプルを含む行を選択し，黒反転させます(図 27)。①Shortcut，②QuanLynx，③Process Samples の順にクリックし，Create QuanLynx Dataset 画面を開きます。

Operations 内の Integrate Samples，Calibrate Standards，Quantify Samples にチェックを入れます。Quantify 内の From Sample　To Sample 欄は既に選択された行番号の範囲が入力されています。Method は先ほど作成した定量用メソッドファイルを指定します。Curve は Math1 を指定してください。

OK ボタンを押します。

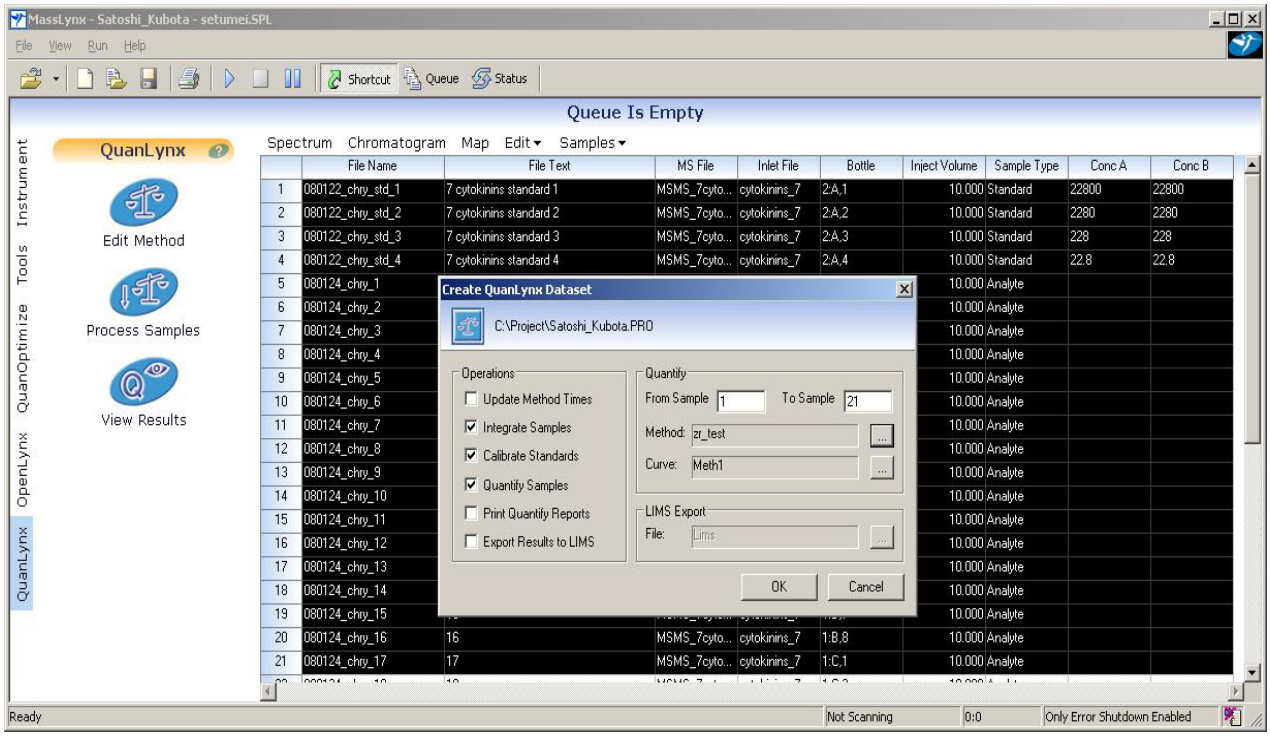
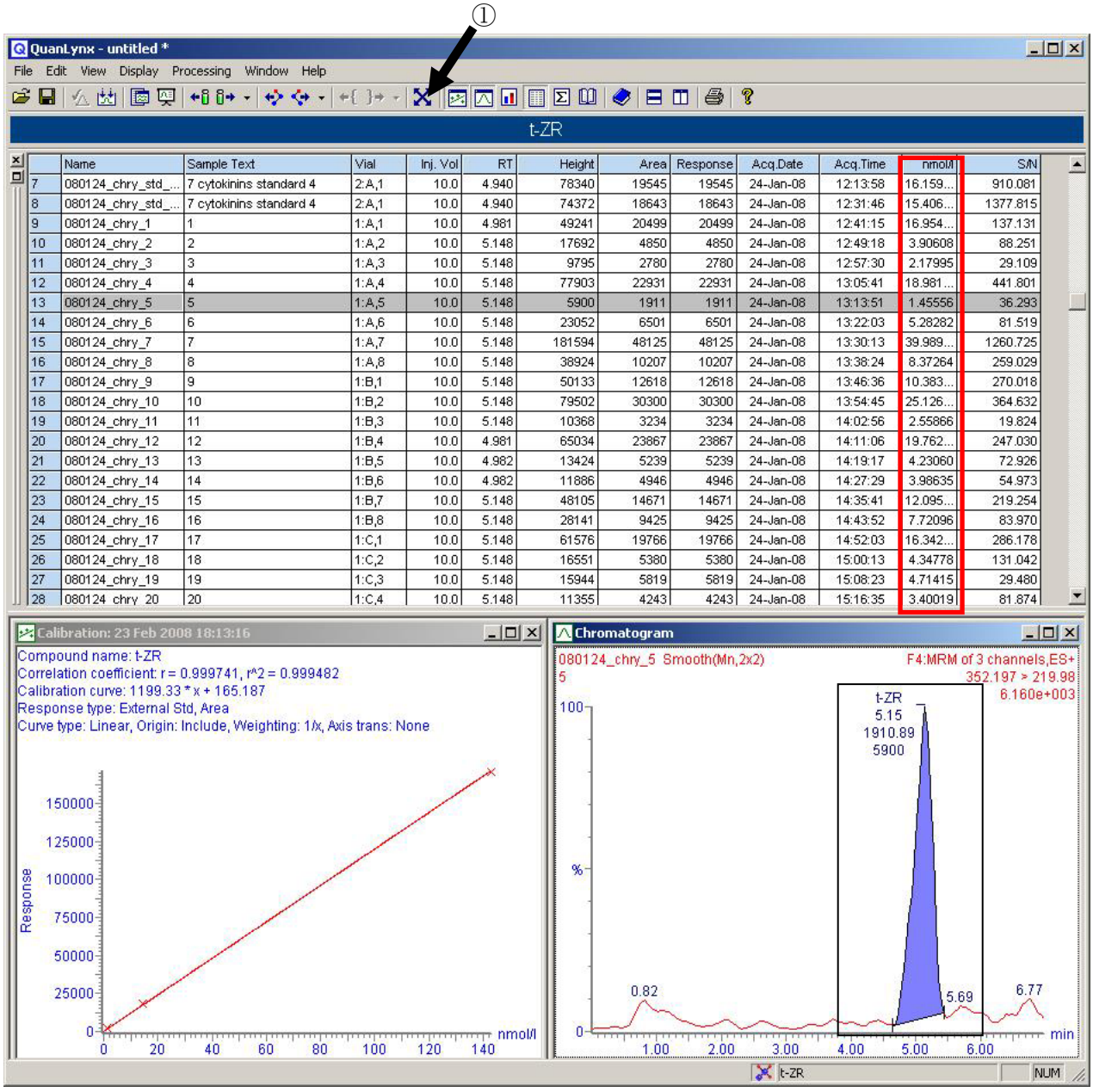


図 27　定量メッソッドの実行

以下のような結果が表示されます。Default の設定では画面の上半分の Summary ウィンドウにサンプル情報が，下左半分の Calibration ウィンドウに検量線が，下右半分の Chromatogram ウィンドウに選択行のクロマトグラムが表示されています。クロマトグラムはピーク部分が拡大して表示されている場合があります。もし，クロマトグラムの全体を表示させたいのなら，クロマトグラムウィンドウをアクティブにした後，①拡大ボタンを押してください。

定量結果は Summary ウィンドウの右から 2 列目のカラムに示されています。



	Name	Sample Text	Vial	Inj. Vol	RT	Height	Area	Response	Acq.Date	Acq.Time	nmol/l	S/N
7	080124_chry_std_...	7 cytokinins standard 4	2:A,1	10.0	4.940	78340	19545	19545	24-Jan-08	12:13:58	16.159...	910.081
8	080124_chry_std_...	7 cytokinins standard 4	2:A,1	10.0	4.940	74372	18643	18643	24-Jan-08	12:31:46	15.406...	1377.815
9	080124_chry_1	1	1:A,1	10.0	4.981	49241	20499	20499	24-Jan-08	12:41:15	16.954...	137.131
10	080124_chry_2	2	1:A,2	10.0	5.148	17692	4850	4850	24-Jan-08	12:49:18	3.90608	88.251
11	080124_chry_3	3	1:A,3	10.0	5.148	9795	2780	2780	24-Jan-08	12:57:30	2.17995	29.109
12	080124_chry_4	4	1:A,4	10.0	5.148	77903	22931	22931	24-Jan-08	13:05:41	18.981...	441.801
13	080124_chry_5	5	1:A,5	10.0	5.148	5900	1911	1911	24-Jan-08	13:13:51	1.45556	36.293
14	080124_chry_6	6	1:A,6	10.0	5.148	23052	6501	6501	24-Jan-08	13:22:03	5.28282	81.519
15	080124_chry_7	7	1:A,7	10.0	5.148	181594	48125	48125	24-Jan-08	13:30:13	39.989...	1260.725
16	080124_chry_8	8	1:A,8	10.0	5.148	38924	10207	10207	24-Jan-08	13:38:24	8.37264	259.029
17	080124_chry_9	9	1:B,1	10.0	5.148	50133	12618	12618	24-Jan-08	13:46:36	10.383...	270.018
18	080124_chry_10	10	1:B,2	10.0	5.148	79502	30300	30300	24-Jan-08	13:54:45	25.126...	364.632
19	080124_chry_11	11	1:B,3	10.0	5.148	10368	3234	3234	24-Jan-08	14:02:56	2.55866	19.824
20	080124_chry_12	12	1:B,4	10.0	4.981	65034	23867	23867	24-Jan-08	14:11:06	19.762...	247.030
21	080124_chry_13	13	1:B,5	10.0	4.982	13424	5239	5239	24-Jan-08	14:19:17	4.23060	72.926
22	080124_chry_14	14	1:B,6	10.0	4.982	11886	4946	4946	24-Jan-08	14:27:29	3.98635	54.973
23	080124_chry_15	15	1:B,7	10.0	5.148	48105	14671	14671	24-Jan-08	14:35:41	12.095...	219.254
24	080124_chry_16	16	1:B,8	10.0	5.148	28141	9425	9425	24-Jan-08	14:43:52	7.72096	83.970
25	080124_chry_17	17	1:C,1	10.0	5.148	61576	19766	19766	24-Jan-08	14:52:03	16.342...	286.178
26	080124_chry_18	18	1:C,2	10.0	5.148	16551	5380	5380	24-Jan-08	15:00:13	4.34778	131.042
27	080124_chry_19	19	1:C,3	10.0	5.148	15944	5819	5819	24-Jan-08	15:08:23	4.71415	29.480
28	080124_chry_20	20	1:C,4	10.0	5.148	11355	4243	4243	24-Jan-08	15:16:35	3.40019	81.874

図 28　定量結果の表示

クロマトグラムの波形処理を手動で変更したい場合は，クロマトグラムウィンドウをアクティブにし，拡大する範囲をマウスで指定します(図 28)。拡大されたピークの内側をクリックすると，ピークの開始点と終了点が表示されます(図 29-A)。この開始点と終了点をマウスでドラッグし，任意の場所まで移動します(図 29-B)。この結果を保存するには，クロマトグラムウィンドウで右クリックするとメニューが現れるので，Save Peak Modification を選んでください(図 29-C)。コメント入力が求められますが，コメントは任意です。Yes を押せば，変更が反映され，No をおせば変更は反映されません。

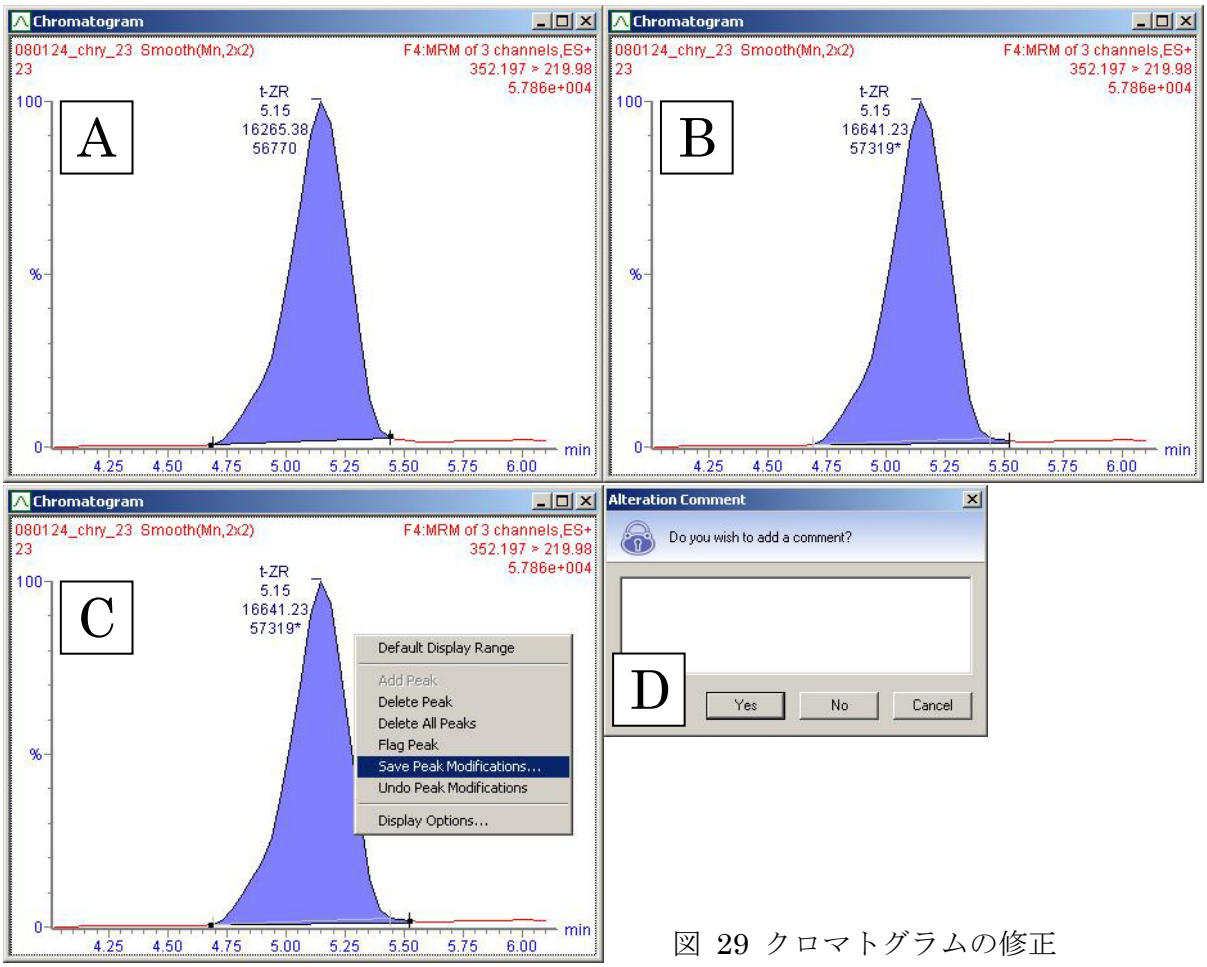


図 29 クロマトグラムの修正

図 29 のサマリーには表示されていませんが，ピークが手動で修正されているかどうかをサマリーで確認するには，サマリーウィンドウにカーソルを置き，マウスを右クリックするとポップアップメニューがでます。その中の Change column order をクリックし，リストから Detection Flags を選択します。サマリー中に Detection Flags というカラムが表示され，手動でピークが変更されている場合はそのセル中に MM というフラグが立ちます。

定量結果のレポートは以下のようにします。

定量結果レポート画面の[File]-[Export]-[Complete Summary]を選択します。すると Tab 区切りのテキストファイルとして保存できるので，任意のフォルダを指定して保存します。このファイルは Excel で直接読み込むことができます。

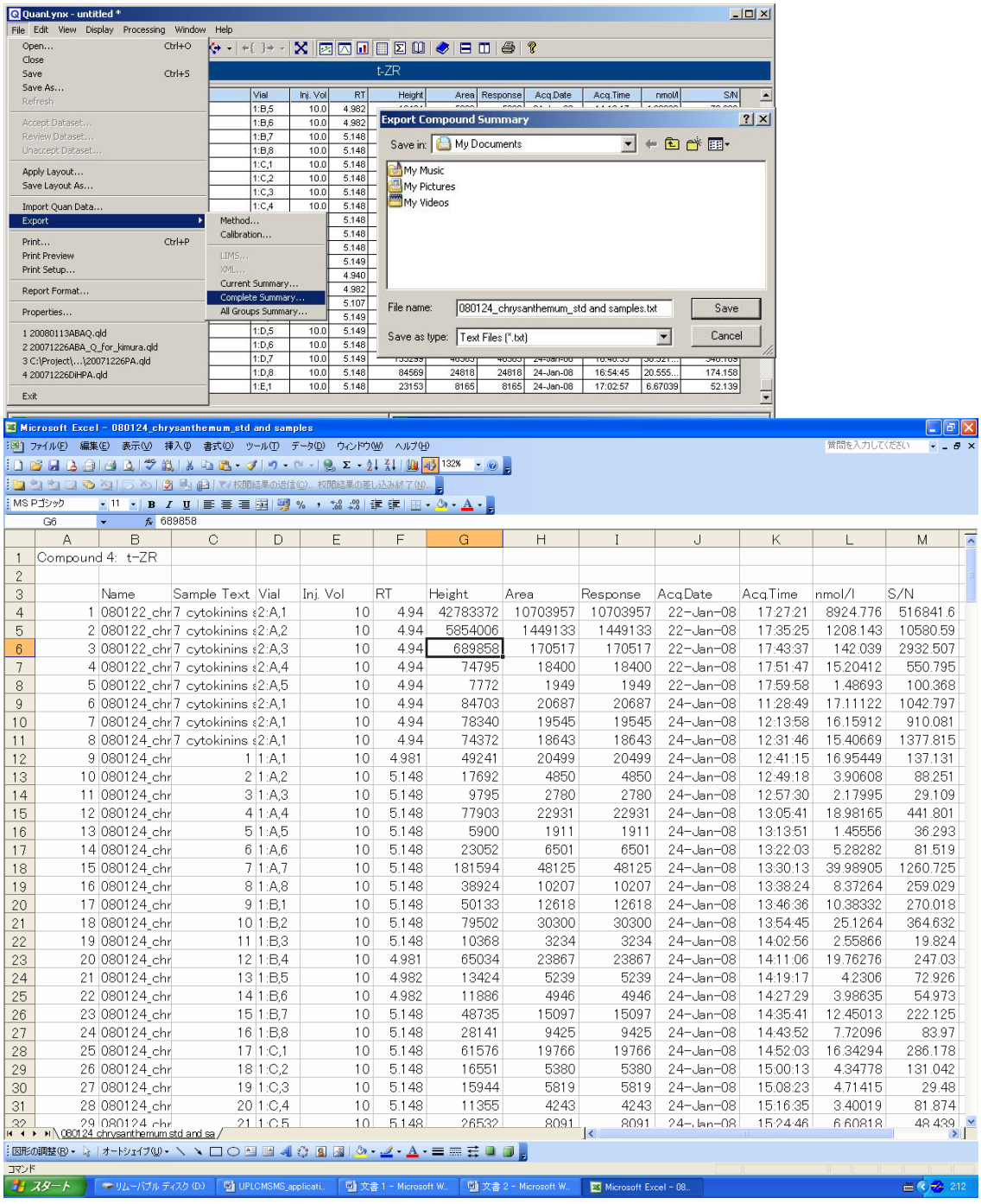


図 30 定量結果のレポート

以上で，定量操作は終了です。定量のパラメーターは多岐にわたるため，このマニュアルでは説明していないものも多くあります。パラメーターの詳細をお知りになりたい場合は，総研備え付けの「MassLynx トレーニングテキスト」をご覧ください。

作成：植物資源科学科：窪田　聡